

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年8月15日 (15.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/062944 A2

- (51) 国際特許分類: C12N
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00852
- (22) 国際出願日: 2002年2月1日 (01.02.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-26820 2001年2月2日 (02.02.2001) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 大瀬 徹也 (OHTAKI, Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ802号
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都 中央区 八重洲2丁目8番7号 福岡ビル9階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, Ibaraki (JP). 増田 安司 (MASUDA, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0032 茨城県 つくば市 竹園1丁目8番地14 つくば・さくら団地906-210 Ibaraki (JP). 高津 吉広 (TAKATSU, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒305-0032 茨城県 つくば市 竹園1丁目6番地2 つくば・さくら団地905-505 Ibaraki (JP). 渡辺 卓也 (WATANABE, Takuya) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府 大阪市 淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka (JP). 寺尾 寧子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP]; 〒658-0063 兵庫県 神戸市 東灘区住吉山手2丁目6番1号 セントヒル2-E号 Hyogo (JP). 新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府 大阪市 淀川区新高6丁目14番8-606号 Osaka (JP). 日沼 州司 (HINUMA, Syuji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki (JP).
- [続葉有]

(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規生理活性ペプチドおよびその用途

(57) Abstract: It is intended to provide remedies/preventives and diagnostics for digestive diseases, etc. More specifically, a method/a kit for screening a compound or its salt capable of promoting or inhibiting the activity of a novel peptide, etc.; compounds or salts thereof obtained by the screening; drugs containing these compounds or salts thereof; are provided. This peptide is useful in, for example, diagnosing, treating and preventing digestive diseases, etc. It is also useful as a reagent for screening a compound or its salt capable of promoting or inhibiting the activity of the protein.

(57) 要約:

本発明は、消化器疾患などの治療・予防剤および診断薬の提供を目的とする。

具体的には、新規ペプチド等の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングによって得られる化合物またはその塩、該化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。本発明のペプチドは、例えば、消化器疾患などの診断、治療、予防などに使用することができ、かつ、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。



ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書なし; 報告書を受け取り次第公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規生理活性ペプチドおよびその用途

技術分野

- 5 本発明は、(i) 配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、および(ii) オーフアンレセプタータンパク質である配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩とを用いる消化器疾患の予防・治療剤として有用な化合物またはその塩などのスクリーニング方法などに関する。
- 10

背景技術

- 生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節、感覚受容などの重要な機能調節は、様々なホルモンや神経伝達物質のような内在性因子あるいは光や匂いなどの感覚刺激をこれらに対して生体が備えている細胞膜に存在する特異的なレセプターを介して細胞が受容し、それに応じた反応をすることによって行われている。このような機能調節に与るホルモンや神経伝達物質のレセプターの多くは guanine nucleotide-binding protein (以下、Gタンパク質と略称する場合がある) と共役しており、このGタンパク質の活性化によって細胞内にシグナルを伝達して様々な機能を発現させることを特徴とする。また、これらのレセプタータンパク質は共通して7個の膜貫通領域を有する。これらのことからこうしたレセプターはGタンパク質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称される。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質およびそれに対するレセプタータンパク質が存在して相互作用し、重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質(ホルモンや神経伝達物質など)およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについてはいまだ不明なことが多い。
- 15
- 20
- 25

近年、ヒトゲノムDNAあるいは各種ヒト組織由来のcDNAのランダムな配

列決定による配列情報の蓄積および遺伝子解析技術の急速な進歩によってヒトの遺伝子が加速度的に解明されてきている。それにともない、機能未知の蛋白をコードすると予想される多くの遺伝子の存在が明らかになっている。Gタンパク質共役型レセプターは、7個の膜貫通領域を有するのみでなくその核酸あるいはアミノ酸に多くの共通配列が存在するためそのような蛋白の中から明確にGタンパク質共役型レセプターとして区分することができる。一方でこうした構造の類似性を利用したポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によってもこうしたGタンパク質共役型レセプター遺伝子が得られている。このようにしてこれまでに得られたG蛋白共役型レセプターのうちには既知のレセプターとの構造の相同性が高いサブタイプであって容易にそのリガンドを予測することが可能な場合もあるが、ほとんどの場合その内在性リガンドは予測不能であり、これらのレセプターは対応するリガンドが見いだされていない。このことからこれらのレセプターはオーファンレセプターと呼ばれている。このようなオーファンレセプターの未同定の内因性リガンドは、リガンドが知られていなかったために十分な解析がなされていなかった生物現象に関与している可能性がある。そして、このようなリガンドが重要な生理作用や病態と関連している場合には、そのレセプター作動薬あるいは拮抗薬の開発が革新的な医薬品の創製に結びつくことが期待される (Stadel, J. et al., *TiPS*, 18巻、430-437頁、1997年、Marchese, A. et al., *TiPS*, 20巻、370-375頁、1999年、Civelli, O. et al., *Brain Res.*, 848巻、63-65頁、1999年)。しかし、これまで実際にオーファンGタンパク質共役型レセプターのリガンドを同定した例はそれほど多くない。

最近、幾つかのグループによってこうしたオーファンレセプターのリガンド探索の試みがなされ、新たな生理活性ペプチドであるリガンドの単離・構造決定が報告されている。ReinsheidらおよびMeunierらは独立に、動物細胞にオーファンGタンパク質共役型レセプターLC132あるいはORL1をコードするcDNAを導入してレセプターを発現させ、その応答を指標としてorphanin FQあるいはnociceptinと名付けられた新規ペプチドをブタ脳あるいはラット脳の抽出物より単離し、配列を決定した (Reinsheid, R. K. et al., *Science*, 270巻、792-794頁、1995年

、Meunier, J.-C. et al.、Nature、377巻、532-535頁、1995年）。このペプチドは痛覚に関与していることが報告されたが、さらに、レセプターのノックアウトマウスの研究により記憶に関与していることが明らかにされた (Manabe, T. et al.、Nature、394巻、577-581頁、1998年)。

- 5 その後これまでに上記と同様な方法によりPrRP (prolactin releasing peptide)、orexin、apelin、ghrelinおよびGALP (galanin-like peptide) などの新規ペプチドがオーファンGタンパク質共役型レセプターのリガンドとして単離された (Hinuma, S. et al.、Nature、393巻、272-276頁、1998年、Sakurai, T. et al.、Cell、92巻、573-585頁、1998年、Tatemoto, K. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、251巻、471-476頁、1998年、Kojima, M. et al.、Nature、402
10 巻、656-660頁、1999年、Ohtaki, T. et al.、J. Biol. Chem.、274巻、37041-37045頁、1999年)。

- 一方、これまで明らかでなかった生理活性ペプチドのレセプターが同様な方法によって解明される場合もある。腸管収縮に関与するmotilinのレセプターがGPR
15 38であることが明らかにされた (Feighner, S. D. et al.、Science、284巻、2184-2188頁、1999年) ほか、SLC-1がメラニン凝集ホルモン (MCH) のレセプターとして同定され (Chambers, J. et al.、Nature、400巻、261-265頁、1999年、Saito, Y. et al.、Nature、400巻、265-269頁、1999年、Shimomura, Y. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、261巻、622-626頁、1999年、Lembo, P. M.
20 C. et al.、Nature Cell Biol.、1巻、267-271頁、1999年、Bachner, D. et al.、FEBS Lett.、457巻、522-524頁、1999年)、またGPR14 (SENRL) がurotensin IIのレセプターであることが報告された (Ames, R. S. et al.、Nature、401巻、282-286頁、1999年、Mori, M. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、265巻、123-129頁、1999年、Nothacker, H.-P. et al.、Nature Cell Biol.、1巻
25 、383-385頁、1999年、Liu, Q. et al.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、266巻、174-178頁、1999年)。MCHはそのノックアウトマウスが羸瘦のphenotypeを示すことから肥満に関与することが示されていたが (Shimada, M. et al.、Nature、396巻、670-674頁、1998年)、そのレセプターが明らかにされたことにより抗肥満薬としての可能性を有するレセプター拮抗薬の探索が可能となった。また

、urotensin IIはサルに静脈内投与することによって心虚血を惹起することから心循環系に強力な作用を示すことも報告されている（Ames, R. S. et al., Nature, 401巻、282-286頁、1999年）。

5 このように、オーファンレセプターおよびそのリガンドは新たな生理作用に関与する場合が多く、その解明は新たな医薬品開発に結びつくことが期待される。しかし、オーファンレセプターのリガンド探索においては多くの困難さが伴い、これまでに数多くのオーファンレセプターの存在が明らかにされながらそのリガンドが明らかにされたレセプターはごく一部に過ぎない。

10 本発明者らは、オーファンGタンパク質共役型レセプターである新規レセプターZ A Q（本願明細書の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質：以下、本明細書において、単にZ A Qと称する場合がある）を見出したが、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。

15 オーファンレセプタータンパク質であるZ A Qに対するリガンドの探索と、Z A Qおよびそのリガンドを用いることを特徴とする化合物などのスクリーニング方法の確立が課題とされていた。

発明の開示

20 本発明者らは、ヒト型B v 8ペプチド（FEBS Letters, 462巻、177-181頁、1999年）を作成し、これがZ A Q結合活性を有することを見出した。さらに、ラット型B v 8をコードするc DNAのクローニングにも成功した。

25 かかる知見に基づいて、ヒト型／マウス型／ラット型B v 8ペプチドを用いたスクリーニング系を用いて、Z A Qの介在する疾患の治療薬（Z A Q拮抗薬または作動薬など、具体的には消化器疾患の予防・治療薬など）のスクリーニングができることを見出し、鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（1）配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプチ

- ドまたはその塩および配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 5 (2) 配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプチドまたはその塩および配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 15 (3) 前記(1)記載のスクリーニング方法または前記(2)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- 20 (4) 前記(3)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (5) 消化器疾患の予防・治療剤である前記(4)記載の医薬、
- (6) 配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドまたはその塩、
- (7) 前記(6)記載のペプチドをコードするDNA、
- 5 (8) 配列番号：38で表される塩基配列を含有する前記(7)記載のDNA、
- (9) 配列番号：40で表される塩基配列を含有するDNA、
- (10) 前記(8)記載のDNAを含有する組換えベクター、
- (11) 前記(10)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- 前記(11)記載の形質転換体を培養し、前記(6)記載のペプチドを生成・蓄
- 10 積することを特徴とする前記(6)記載のペプチドまたはその塩の製造法、
- (13) 配列番号：39で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (14) 前記(13)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (15) 消化器疾患の診断薬である前記(14)記載の診断薬、
- 15 (16) 外来性の、前記(7)記載のDNAまたはその変異DNAを含有する非ヒト哺乳動物、
- (17) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である前記(16)記載の動物、
- (18) ゲッ歯動物がラットである前記(17)記載の動物、
- (19) 外来性の、前記(9)記載のDNAまたはその変異DNAを含有し、非
- 20 ヒト哺乳動物において発現しうる組換えベクター、
- (20) 前記(7)または前記(9)記載のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (21) DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化された前記(20)記載の胚幹細胞、
- 25 (22) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である前記(21)記載の胚幹細胞、
- (23) 前記(7)または前記(9)記載のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (24) DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる前記

(23) 記載の非ヒト哺乳動物、

(25) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である前記(23) 記載の非ヒト哺乳動物

(26) 前記(24) 記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の
5 発現を検出することを特徴とする前記(7) または(9) 記載のDNAに対する
プロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方
法、

(27) 哺乳動物に対し、前記(3) 記載の化合物またはその塩の有効量を投与
することを特徴とする消化器疾患の予防・(及び/または) 治療方法、

10 (28) 消化器疾患予防・(及び/または) 治療剤を製造するための、前記(3)
) 記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。

さらには、本発明は、

(29) 配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同
一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプ
15 チドまたはその塩(以下、本発明のペプチドと略記する場合がある)を、配列番
号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53も
しくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のア
ミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩(以下
、これらを本発明のタンパク質と略記する場合がある)に接触させた場合と、本
20 発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質に接触させた場合におけ
る、本発明のペプチドの本発明のタンパク質に対する結合量を測定し、比較する
ことを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化さ
せる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(30) 本発明のペプチドを、本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞
25 の膜画分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタ
ンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発
明のペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを
特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化
合物またはその塩のスクリーニング方法、

(31) 本発明のタンパク質が、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質である前記(30)記載のスクリーニング方法、

5 (32) 本発明のペプチドが、標識したリガンドである前記(29)～(31)記載のスクリーニング方法、

(33) 本発明のペプチドを本発明のタンパク質に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10

(34) 本発明のペプチドを本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

15

(35) 本発明のタンパク質が、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質である前記(34)記載のスクリーニング方法、

20 (36) 標識したGTP γ Sの存在下、本発明のペプチドを本発明のタンパク質細胞膜面分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質細胞膜面分に接触させた場合における、本発明のタンパク質細胞膜面分へのGTP γ S結合促進活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

25

(37) 細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生抑制活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチド

と本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (38) 細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

- (39) 本発明のペプチドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (40) 本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (41) 標識したイノシトールの存在下、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、イノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

- (42) 本発明のペプチドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化さ

せる化合物のスクリーニング方法、

(43) 本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペ
5 プチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(44) 標識したルビジウムの存在下、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、標識したルビジウムの流出活
10 性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(45) 本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、細胞外のpH変化を測定し、比較することを特徴とする、本
15 発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(46) ヒスチジン合成遺伝子導入本発明のタンパク質発現酵母を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペ
20 チドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(47) 本発明のペプチドを、本発明のタンパク質遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた
25 場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(48) 前記(29)～(47)記載のスクリーニング方法で得られる、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- (49) 前記(48)記載の化合物またはその塩を含有する医薬、
- (50) 本発明のタンパク質を含有する細胞を含有することを特徴とする前記(2)記載のスクリーニング用キット、
- (51) 本発明のタンパク質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする前記(2)記載のスクリーニング用キット、
- 5 (52) 本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したタンパク質を含有することを特徴とする前記(2)記載のスクリーニング用キット、
- 10 (53) 前記(50)～(52)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- (54) 前記(50)～(52)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有する医薬、
- 15 (55) 前記(11)記載の抗体と、本発明のペプチドとを接触させることを特徴とする、本発明のペプチドの定量法、
- (56) 前記(11)記載の抗体と、被検液および標識化された本発明のペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、
- 20 (57) 被検液と担体上に不溶化した前記(11)記載の抗体および標識化された前記(11)項記載の抗体とを同時または連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドまたはその塩の定量法、
- 25 (58) 前記(7)記載のDNAとハイストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド、および
- (59) 前記(7)記載のDNAの塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドなども提供する。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列(ZAQC)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図2に続く)。

- 5 図2は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列(ZAQC)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図1の続き、図3に続く)。

- 図3は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列(ZAQC)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図2の続き)
10)。

図4は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列(ZAQT)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図5に続く)。

- 図5は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列(ZAQT)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図4の続き、図6に続く)。
15

図6は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質をコードするDNAの塩基配列(ZAQT)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図5の続き)。

- 20 図7は、実施例1で得られたヒト脳由来タンパク質の疎水性プロットを示す。

図8は、実施例1で行われたZAQの発現分布の解析結果を示す。

図9は、実施例4で行われたヒト型Bv8ペプチドおよびMIT1のZAQレセプター活性化作用の測定結果を示す。図中、-○-はヒト型Bv8ペプチドを、-●-はMIT1を示す。

- 25 図10は、実施例4で行われたヒト型Bv8ペプチドおよびMIT1のI5Eレセプター活性化作用の測定結果を示す。図中、-○-はヒト型Bv8ペプチドを、-●-はMIT1を示す。

図11は、実施例8で行われたヒト型Bv8ペプチドおよびMIT1の収縮実験の結果を示す。図中、-○-はヒト型Bv8ペプチドを、-●-はMIT1を

示す

発明を実施するための最良の形態

- 本発明のスクリーニング方法および本発明のスクリーニング用キットに用いられる配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドまたはその塩（以下、本発明のペプチドと略記することがある）は、配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記することがある）と結合する能力を有するペプチドまたはその塩であり、本発明のタンパク質と結合し、活性化する能力を有するペプチドまたはその塩である。本発明のペプチドまたはその塩の本発明のタンパク質と結合する能力および本発明のタンパク質を活性化する能力は後述の方法により測定することができる。
- 15 本発明のペプチドは、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質

- 、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など
- 5 (特に、脳や脳の各部位)に由来するペプチドであってもよく、また合成ペプチドであってもよい。

本発明のペプチドがシグナル配列を有している場合は該ペプチドを効率良く細胞外に分泌させることができる。

- 配列番号：19または配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：19または配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と約60%以上(好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上)の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。
- 10

- 15 配列番号：19または配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：19または配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：19または配列番号：39で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましい。

- 20 以下、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをヒト型Bv8成熟体ペプチド、配列番号：39で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをラット型Bv8成熟体ペプチドまたはマウス型Bv8成熟体ペプチドと記載することがある。

- 25 配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：17または配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：39で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同質の活性を有するペプチドなどが好ましく、具体的には配列番号：37、配列番号：39または配列番号：55で表わされるアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

以下、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをヒト型Bv8前駆体ペプチドと記載することがある。配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをラット型Bv8前駆体ペプチドと記載することがある。配列番号：55で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをマウス型Bv8前駆体ペプチドと記載することがある。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

これらの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するスクリーニング方法などに従って測定することができる。

また、本発明のペプチドとしては、(i) 配列番号：19または配列番号：39で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～20個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：19または配列番号：39で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～40個程度、より好ましくは1～30個程度、なかでも好ましくは1～20個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：19または配列番号：39で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～40個程度、より好ましくは1～30個程度、なかでも好ましくは1～20個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(iv) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用い

れる。

本発明のペプチドの部分ペプチドとしては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできるものであれば、いかなるものであってもよく、本発明のペプチドと実質的に同質の活性を有していればよい。該部分ペプチドのアミノ酸
5 の数は、本発明のペプチドの構成アミノ酸配列のうち少なくとも10個以上、好ましくは20個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

該部分ペプチドとしては、(i) 上記アミノ酸配列中の1または2個以上（
10 好ましくは数個（1～4個））のアミノ酸が欠失し、(ii) 上記アミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または(iii) 上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは数個（1～4個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

15 以下、本発明のペプチドと本発明のペプチドの部分ペプチドとをまとめて本発明のペプチドと称することがある。

本発明のタンパク質は、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（
20 例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは
25 間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-0

1 など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

本発明のタンパク質がシグナル配列を有している場合は該ペプチドまたはタンパク質を効率良く細胞外に分泌させることができる。

本発明のタンパク質(Gタンパク質共役型レセプタータンパク質)として、好ましくは、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列(図1~図3または図4~図6中のアミノ酸配列)と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質などが用いられる。

15 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

20 配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

25 本発明の配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性

質的に同質であることを示す。したがって、本発明のペプチドに対する結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なっているてもよい。

- 5 本発明のペプチドに対する結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なう。

以下、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をZ A Qと記載することがある。

- また、本発明のタンパク質としては (i) 配列番号：1で表わされるアミノ酸
10 配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列
15 番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または (iv) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

- 配列番号：44で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とし
20 ては、例えば、配列番号：44で表わされるアミノ酸配列と約97%以上、好ましくは約98%以上、より好ましくは約99%以上、最も好ましくは約99.5%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 配列番号：44で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：44で表わされるアミノ酸配列と
25 実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：44で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：44で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：44で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：44

で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約96%以上、より好ましくは約97%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：51で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：51で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：52で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、具体的にはWO 98/46620に記載のタンパク質などが挙げられる。

配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約96%以上、より好ましくは約97%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 5 配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：53で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 10 配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：53で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、具体的には、Biochem. Biophys. Acta, 1491巻, 369-375頁, 2000年に記載のタンパク質などが挙げられる。

- 15 配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と約95%以上、好ましくは約96%以上、より好ましくは約97%以上、最も好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 20 配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 25 配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましく、具体的にはWO 98/46620に記載のタンパク質などが挙げられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のペプチドに対する結合活性、

シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、本発明のペプチドに対する結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約 0.5～2 倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なっている。5

結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができる。

さらに、本発明のタンパク質としては、(i) 配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53 または配列番号：54 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53 または配列番号：54 で表わされるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53 または配列番号：54 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1～30 個程度、より好ましくは 1～10 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または (iv) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。10 15 20

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1 または配列番号：52 で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来のタンパク質、配列番号：44 または配列番号：51 で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のタンパク質、配列番号：53 または配列番号：54 で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来のタンパク質などがあげられる。25

本明細書におけるペプチドおよびタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。配列番号：47 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする本発明のタンパク質は、C 末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート

($-\text{COO}^-$)、アミド ($-\text{CONH}_2$) またはエステル ($-\text{COOR}$) であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

10 本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質（本発明のペプチド・タンパク質）がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のペプチド・タンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

15 さらに、本発明のペプチド・タンパク質には、上記したペプチド・タンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、
20 アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチド・糖タンパク質などの複合ペプチド・複合タンパク質なども含まれる。

本発明のペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：19で表わされるア
25 ミノ酸配列を含有するヒト由来のペプチド、配列番号：39で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来またはマウス由来のペプチドなどがあげられる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1または配列番号：52で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のタンパク質、配列番号：44または配列番号：51で表わされるアミノ酸

配列を含有するラット由来のタンパク質、配列番号：53または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来のタンパク質などがあげられる。

5 本発明のタンパク質の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のタンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、実質的に同質のリガンド結合活性を有するものなどが用いられる。

10 具体例として、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質の部分ペプチドとしては、図7で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

15 本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

20 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質のリガンド結合活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質のリガンド結合活性」の測定は公知の方法に準じて行なうことができる。

25 また、本発明の部分ペプチドは、配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53または配列番号：54で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、その

アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。本発明の部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のペプチドもしくはタンパク質またはその塩は、前述したヒトや非ヒト哺乳動物の細胞または組織から公知のペプチド・タンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のペプチド、配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51または配列番号：52で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド・タンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。さらに、配列番号：53で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩は、Biochem. Biophys. Acta, 1491巻, 369-375頁, 2000年に記載の方法に準じて製造できる。配列番号：52または配列番号

: 54で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質またはその塩は、WO 98/46620に記載の方法に準じて製造できる。

ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液
5 を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらのアミド体またはそれらの塩の合成には、通常市販のペプチド・タンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fm
10 o cアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチド・タンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチド・タンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、
20 目的のペプチド・タンパク質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ペプチド・タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用
25 いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド・

- タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。
- 15 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。
- 20 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベン
- 25 ジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低

級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

- 5 チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、Cl₂-Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

- ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。
- 10

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料
- 15
- のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、
- 20
- フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-
- 25

エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチド・タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチド・タンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したペプチド・タンパク質とを製造し、この両ペプチド・両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチド・保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチド・粗タンパク質を得ることができる。この粗ペプチド・粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチド・タンパク質のアミド体を得ることができる。

ペプチド・タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチド・タンパク質のアミド体と同様にして、所望のペプチド・タンパク質のエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質は、公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。また、本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドもしくは本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドまたはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。

公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の (i) ~ (v) に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

5 (ii) SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

10 (v) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドまたは本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドまたは部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

15

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを

20

25

を用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、配列番号：19で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：20で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAとハイス

トリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 5 配列番号：20で表わされる塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：20または配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNA等が挙げられる。

配列番号：20で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：20で表わ
10 される塩基配列と95%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

具体的には、配列番号：39で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：40または配列番号：57で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：40または配列番号：57で
15 表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のペプチドと実質的に同質の活性（例、本発明のタンパク質に対する結合活性、本発明のタンパク質を介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：40または配列番号：57で表わされる塩基配列を含有するDNA
20 としては、配列番号：38、配列番号：40、配列番号：56または配列番号：57で表わされる塩基配列を含有するDNA等が挙げられる。

配列番号：40または配列番号：57で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、
25 配列番号：40または配列番号：57で表わされる塩基配列と95%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

また、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩

基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

- 5 配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 10 配列番号：44で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：43で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：43で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：43で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：43で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 20 配列番号：51で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：50で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：50で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：50で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：50で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：6で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：6で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：53で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：63で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：63で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：63で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：63で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：63で表わされる塩基配列と約95%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：64で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：64で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：64で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：64で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：64で表わされる塩基配列と約95%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 5 ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェント
- 10 な条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

- 15 より具体的には、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：20で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：39で表わされるアミノ酸配列を含有するペ
- 20 プチドをコードするDNAとしては、配列番号：40または配列番号：57で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：38で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：55で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：56
- 25 で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられる。

また、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：44で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：43で表わされる塩基配

列を含有するDNAがあげられ、配列番号：51で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：50で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：52で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：53で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：63で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられ、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：64で表わされる塩基配列を含有するDNAがあげられる。

10 本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列と相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）とは、本発明のペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のペプチドの遺伝子の複製又は発現を阻害することの
15 できるアンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたペプチドをコードするDNAの塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）は、本発明のペプチドの遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいは本発明のペプチド関連RNAとの相互作用を介して本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御することができる。
20 本発明のペプチド関連RNAの選択された配列に相補的な（オリゴ）ヌクレオチド、及び本発明のペプチド関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドは、生体内及び生体外で本発明のペプチドの遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。
25 る。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチドとの間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチドのアミノ酸を通常指

している。本発明のペプチドの遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、本
5 発明のペプチドの遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的な(オリゴ)ヌクレオチドとの関係、あるいは、対象物とハイブリダイズすることができる(オリゴ)ヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということが出来る。アンチセンス・(オリゴ)ヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリ
10 ヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー(例えば、市販のタンパク質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー)又は特殊な結合を含有するその他のポリマー(但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナ
15 グや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレ
20 オチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えばタンパク質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど)や糖
25 (例えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例えば、アクリジン、ソラレンなど)を持つもの、キレート化合物(例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 α

アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは

5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reactionによって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：43、配列番号：50、配列番号：6、配列番号：63または配列番号：64で表わされる塩基配列を含有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(ii)配列番号：2、配列番号：3、配列番号：43、配列番号：50、配列番号：6、配列番号：63または配列番号：64で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、本発明のペプチドに対する結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：43、配列番号：50、配列番号：

6、配列番号：63または配列番号：64で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：43、配列番号：50、配列番号：6、配列番号：63または配列番号：64で表わされる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のペプチドをコードするDNAの塩基配列の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

本発明のタンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングも本発明のペプチドを完全にコードするDNAのクローニングと同様にして行うことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km（宝酒造（株））、MutanTM-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたペプチド・タンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のペプチド・タンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のペプチド・タンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、
(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- 5 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、
、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、p
10 Rc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo、pcDNA3.1、pRc/CMV2、pRc/RSV（Invitrogen社）などが用いられる。

- 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、HIV-
15 LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

- これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーター
20 などが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

- 25 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシ

リン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

- 5 また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のペプチド・タンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

- 15 宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクレック・アシズ・リサーチ,（*Nucleic Acids Research*）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（*Journal of Molecular Biology*）, 120巻, 517（1978）〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459（1969）〕, C600〔ジェネティクス（*Genetics*）, 39巻, 440（1954）〕などが用いられる。

- 25 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）MI114〔ジーン, 24巻, 255（1983）〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（*Journal of Biochemistry*）, 95巻, 87（1984）〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ（*Saccharomyces cere*

visiae) AH 2 2, AH 2 2 R⁻, NA 8 7-1 1 A, DKD-5 D, 2 0 B-1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (Pichia pastoris) などが用いられる。

- 5 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; S f細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG 1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞)
- 10 などが用いられる。該S f細胞としては、例えば、S f 9細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)〕。

- 15 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-2 0, マウスミエローマ細胞, ラットGH 3, ヒトFL細胞などが用いられる。

- 20 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. . Sci. USA), 6 9 巻, 2 1 1 0 (1 9 7 2) やジーン (Gene), 1 7 巻, 1 0 7 (1 9 8 2) などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 1 6 8 巻, 1 1 1 (1 9 7 9) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 1 9 4 巻, 1 8 2-1 8 7 (1 9 9 1)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・

ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる

5。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、Gタンパク質共役型タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や、
- 5 5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 10 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 15 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・
- 20 ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。
- 25 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のペプチド・タンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のペプチド・タンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のペプチド・タンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際して

は、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や

5 、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にペプチド・タンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるペプチド・タンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

10
15

このようにして得られるペプチド・タンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または

20 他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するペプチド・タンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ペプチド・ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

25

このようにして生成する本発明のペプチドの活性は、標識した本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

また、生成する本発明のタンパク質の活性は、標識した本発明のペプチドとの

結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明のペプチド・タンパク質等と略記することもある）に対する抗体は、本発明のペプチド・タンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のペプチド・タンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明のペプチド・タンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチ

レングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

- 5 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

- 10 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明のペプチド・タンパク質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法
15 、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のペプチド・タンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

- モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なう
20 ことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI
1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株）
25 ）またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿
5 法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

10 [ポリクローナル抗体の作製]

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明のペプチド・タンパク質等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のペプチド・
15 タンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、
20 どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。
25

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投

与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、（i）本発明のペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤、（ii）本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング、（iii）本発明のペプチドまたはその塩の定量、（iv）遺伝子診断剤、（v）アンチセンスDNAを含有する医薬、（vi）本発明の抗体を含有する医薬および診断薬、（vii）本発明のDNAを有する非ヒト動物の作出、（viii）構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザイン、などの実施のために有用である。

特に、本発明の組換えタンパク質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや非ヒト哺乳動物に特異的な本発明のタンパク質に対するリガンドの結合性を变化させる化合物（例、ZAQアゴニスト、ZAQアンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のペプチド、本発明のDNAおよび本発明の抗体の用途について、以下に具体的に説明する。

25 (1) 本発明のペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

後述の実施例に記載したように、本発明のペプチドは、生体内で液性因子として存在し、本発明のタンパク質を活性化し、本発明のタンパク質を発現した細胞の細胞内Ca²⁺イオン濃度を上昇させることから、本発明のタンパク質（Gタンパク質共役型レセプター）のリガンドであることが明らかとなった。

また、本発明のペプチドは、ヘビ毒 Mamba Intestinal Toxin 1 (以下、MIT1と略称する；配列番号：21；Toxicon、28巻、847-856頁、1990年；FEBS Letters、461巻、183-188頁、1999年)とアミノ酸レベルで約63%の相同性が認められる。また、ヒト型Bv8成熟体ペプチド (FEBS Letters 462巻、177-181頁、1999年)は、マウス型Bv8成熟体ペプチド (FEBS Letters 462巻、177-181頁、1999年)またはラット型Bv8成熟体ペプチドとアミノ酸レベルで92.6%の相同性が認められる。

MIT1は回腸や遠位大腸の収縮、あるいは近位大腸の弛緩を引き起こし、その程度は40 mM塩化カリウムに匹敵するほど強いことが報告されている (FEBS Letters、461巻、183-188頁、1999年)が、その作用点や作用メカニズムは解明されていなかった。本発明者らはMIT1の作用も本発明のタンパク質を介して発現されていることを明らかにした。

また、後述の実施例に記載したように、ヒト型Bv8成熟体ペプチドが、腸管収縮活性を有していることを確認した。

さらに、ヒト型Bv8成熟体ペプチドは、MAPキナーゼとPI-3キナーゼを活性化し神経保護作用を有する (European Journal of Neuroscience、13巻、1694-1702頁、2001年)。

以上のことから、本発明のペプチドは腸管の収縮などを制御する活性を有する。したがって、本発明のDNA等が欠損している場合あるいは発現量が異常に減少している場合、例えば、消化器疾患 (例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患 (例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)等、種々の疾病が発症する。好ましくは消化器疾患である。

したがって、本発明のペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、消化器疾患 (例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患 (例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)など、好ましくは消化器疾患などの種々の疾病の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のペプチドが減少あるいは欠損しているために、本発明のタンパク質が発現している細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し

、生体内で本発明のペプチドを発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のペプチドを該患者に投与すること等によって、該患者における本発明のペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤等の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに

油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油等のような天然産出植物油等を溶解または懸濁させる等の通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等）等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50等）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えばヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

本発明のペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、消化器疾患の治療目的で本発明のペプチドを経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき本発明のペプチドを約1 mg～1000 mg、好ましくは約10～500 mg、より好ましくは約10～200 mg投与する。非経口的に投与する場合は、本発明のペプチドの1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、消化器疾患の治療目的で本発明のペプチドを注射剤の形で成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該ペプチドを約1～1000 mg程度、好ましくは約1～200 mg程度、より好ましくは約10～100 mg程度を患部に注射することに

より投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(2) 本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング

本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質（本発明のタンパク質の部分ペプチドも含む）を用いることを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、または本発明のペプチドおよび本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット（以下、本発明のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング用キットと略記する）について以下に詳述する。

本発明のタンパク質を用いるか、または組換え型本発明のタンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いた本発明のペプチドとの結合アッセイ系（リガンド・レセプターアッセイ系）を用いることによって、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。

このような化合物には、本発明のタンパク質を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（ZAQアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（ZAQアンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる」とは、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合を阻害する場合と促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、(i) 本発明のタンパク質に、本発明のペプチドを接触

させた場合と (ii) 上記した本発明のタンパク質に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 5 本発明のスクリーニング方法においては、(i) 上記した本発明のタンパク質に本発明のペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明のタンパク質に本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明のタンパク質に対する本発明のペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して比較する。
- 10 本発明のスクリーニング方法としての具体例としては、例えば、
- (a) 本発明のペプチドを本発明のタンパク質に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質に接触させた場合における、本発明のペプチドの本発明のタンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物
- 15 物またはその塩のスクリーニング方法、
- (b) 本発明のペプチドを、本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、本発明のペプチドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特
- 20 徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- (c) 本発明のタンパク質が、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質である上記 (b) 記載のスクリーニング方法、
- 25 (d) 本発明のペプチドが、標識したリガンドである上記 (a) ~ (c) のスクリーニング方法などのレセプター結合アッセイ系、
- (e) 本発明のペプチドを本発明のタンパク質に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本

発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(f) 本発明のペプチドを本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とする、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

(g) 本発明のタンパク質が、本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のタンパク質である上記 (f) のスクリーニング方法などの細胞刺激アッセイ系などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のタンパク質としては、上記の本発明のタンパク質を含有するものであれば何れのものであってもよい。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させた本発明のタンパク質などが適している。

本発明のタンパク質を製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のタンパク質を含有する細胞あるいは該細胞膜面分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明のタンパク質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明のタンパク質を含有する細胞としては、本発明のタンパク質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などがあげられる。

膜面分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナ

イザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明のタンパク質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

10 該本発明のタンパク質を含有する細胞や膜画分中の本発明のタンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

15 前記のレセプター結合アッセイ系や細胞刺激アッセイ系などのスクリーニング方法を実施するためには、例えば、本発明のタンパク質画分と、本発明のペプチド（例、標識した本発明のペプチド）などが用いられる。本発明のタンパク質画分としては、天然型の本発明のタンパク質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明のタンパク質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、例えば [^3H]、 [^{125}I]、 [^{14}C]、 [^{32}P]、 [^{33}P]、 [^{35}S] など

20 などで標識されたりガンドなどを用いることができる。特に、ボルトン-ハンター試薬を用いて公知の方法で調製した本発明のペプチドの標識体を利用することもできる。

具体的には、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明のタンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結

25

- 合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明のタンパク質や本発明のペプチドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）
- 5、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識した本発明のペプチドを添加し、同時に 10^{-4} ～ 10^{-1} μMの試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、
- 10 望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B₀）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B₀-NSB）を100%とした時、
- 15 特異的結合量（B-NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- また、本発明のタンパク質と本発明のペプチドとの結合を測定する方法として、BIAcore（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いることもできる。この方法では、本発明のペプチドを装置に添付のプロトコールに従ったア
- 20 ミノカップリング法によってセンサーチップに固定し、本発明のタンパク質を含有する細胞または本発明のタンパク質をコードするDNAを含有する形質変換体から精製した本発明のタンパク質または本発明のタンパク質を含む膜画分、あるいは精製した本発明のタンパク質または本発明のタンパク質を含む膜画分および試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセン
- 25 サーチップ上を毎分2～20μlの流量で通過させる。センサーチップ上の本発明のペプチドと本発明のタンパク質とが結合することによって生じる表面プラズモン共鳴の変化を共存する試験化合物が変化させることを観察することによって本発明のタンパク質と本発明のペプチドとの結合を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができる。この方法は、本発明のタンパク質をセンサーチ

ップに固定し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含むリン酸バッファーまたはトリスバッファーなどの緩衝液をセンサーチップ上を通過させる方法を用いても同様に測定することができる。試験化合物としては、上記と同様のものなどがあげられる。

- 5 前記の細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法を実施するためには、本発明のタンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明のタンパク質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。
- 15 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明のタンパク質を発現した細胞が用いられる。本発明のタンパク質を発現した細胞としては、前述の組換え型本発明のタンパク質発現細胞株などが望ましい。形質転換体である本発明のタンパク質発現細胞は安定発現株でも一過性発現株でも構わない。また、動物細胞の種類は上記と同様のものが用いられる。
- 20 試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

上記細胞刺激アッセイ系のスクリーニング方法について、さらに具体的に以下〔1〕～〔12〕に記載する。

〔1〕レセプター発現細胞がレセプターアゴニストによって刺激されると細胞内のGタンパク質が活性化されてGTPが結合する。この現象はレセプター発現細胞の膜画分においても観察される。通常、GTPは加水分解されてGDPへと変化するが、このとき反応液中にGTP γ Sを添加しておくと、GTP γ SはGTPと同様にGタンパクに結合するが、加水分解されずにGタンパクを含む細胞膜に結合した状態が維持される。標識したGTP γ Sを用いると細胞膜に残存した標識されたGTP γ Sを測定することにより、レセプターアゴニストのレセプター発現細胞刺激活性を測定することができる。

この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

この方法は、本発明のタンパク質を含む膜画分を用いて行う。本測定法において本発明のタンパク質膜画分へのGTP γ S結合促進活性を示す物質はアゴニストである。

具体的には、標識したGTP γ Sの存在下、本発明のペプチドを本発明のタンパク質細胞膜画分に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質細胞膜画分に接触させた場合における、本発明のタンパク質細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のペプチドによる本発明のタンパク質細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を抑制する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質細胞膜画分に接触させ、本発明のタンパク質細胞膜画分へのGTP γ S結合促進活性を測定することにより、アゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一例についてより具体的に以下に述べる。

公知の方法に準じて調製した本発明のタンパク質を含む細胞膜画分を、膜希釈緩衝液（50mM Tris、5mM MgCl₂、150mM NaCl、1 μ M

M GDP、0.1% BSA; pH7.4)で希釈する。希釈率は、レセプターの発現量により異なる。これをFalcon 2053に0.2mlずつ分注し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を加え、さらに終濃度200pMとなるように $[^3\text{S}]$ GTP γ Sを加える。25℃で1時間保温した後、氷冷した洗浄用緩衝液(50mM Tris, 5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 0.1% BSA, 0.05% CHAPS; pH7.4) 1.5mlを加えて、ガラス繊維ろ紙GF/Fでろ過する。65℃、30分保温して乾燥後、液体シンチレーションカウンターでろ紙上に残った膜画分に結合した $[^3\text{S}]$ GTP γ Sの放射活性を測定する。本発明のペプチドのみを加えた実験区の放射活性を100%、本発明のペプチドを加えなかった実験区の放射活性を0%とし、本発明のペプチドによるGTP γ S結合促進活性に対する試験化合物の影響を算出する。GTP γ S結合促進活性が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

15 〔2〕本発明のタンパク質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、細胞内cAMPの産生が抑制される。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

20 具体的には、細胞内cAMP量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生抑制活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

25 細胞内cAMP量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

本発明のタンパク質発現細胞内のcAMP産生量は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシなどを免疫して得られた抗cAMP抗体と $[^{125}\text{I}]$ 標識cAMP (ともに市販品)を使用することによるRIA系、または抗cAMP抗体と標識

cAMPとを組み合わせたEIA系で測定することができる。また、抗cAMP抗体を、protein Aまたは抗cAMP抗体産生に用いた動物のIgGなどに対する抗体などを使用して固定したシンチラントを含むビーズと $[^{125}\text{I}]$ 標識cAMPとを使用するSPA (Scintillation Proximity Assay) 法による
5 定量も可能である（アマシャムファルマシアバイオテク社製のキットを使用する）。

本方法において、本発明のペプチドによる本発明のタンパク質発現細胞のcAMP産生抑制活性を阻害する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10 一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させて、cAMP産生抑制活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明のタンパク質発現細胞（例、CHO細胞などの動物細胞）（（ZAQC
15 -B1細胞；後述の実施例2））を24穴プレートに $5 \times 10^4 \text{ cell/well}$ で播種し、48時間培養する。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー（pH7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後、0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温する。反応
20 用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1 μM の本発明のペプチドまたは1 μM の本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した2 μM フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。100 μl の20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、その後氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出す
25 る。抽出液中のcAMP量を、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテク）を用いて測定する。フォルスコリンの刺激によって産生されたcAMP量を100%とし、1 μM の本発明のペプチドの添加によって抑制されたcAMP量を0%として、本発明のペプチドによるcAMP産生抑制活性に対する試験化合物の影響を算出する。本発明のペプチドの活性を阻害して、cAMP

産生活性が例えば50%以上になる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- また、本発明のペプチドの刺激により、細胞内cAMP量が増加する性質を示す本発明のタンパク質発現細胞を使用する場合、本発明のペプチドを本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、該細胞の細胞内cAMPの産生促進活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

- 本方法において、本発明のペプチドによる本発明のタンパク質発現細胞のcAMP産生促進活性を阻害する活性を示す試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させてcAMP産生促進活性を調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうことができる。

- cAMP産生促進活性は、上記のスクリーニング法においてフォルスコリンを添加せずに本発明のタンパク質発現細胞（例、CHO細胞などの動物細胞）に本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加して産生されたcAMPを上記の方法で定量して測定する。

- 〔3〕CRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

- CRE (cAMP response element) を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、CRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。CRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明のタンパク質発現細胞において、cAMPの上昇を伴う刺激は、CREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物（タンパク質）の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を測定することにより、CRE-レポーター

遺伝子ベクター導入細胞内の c AMP 量の変動を検出することができる。

具体的には、細胞内 c AMP 量を増加させる物質の存在下、本発明のペプチドを、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、CRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、レポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞内 c AMP 量を増加させる物質としては、例えば、フォルスコリン、カルシトニンなどが用いられる。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。CRE を含む DNA を、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクロニングサイトに挿入し、CRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のペプチドによるレポーター遺伝子タンパク質の酵素活性抑制を回復させる試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させて、フォルスコリン刺激によって上昇した発光量の本発明のペプチドと同様な抑制を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

CRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明のタンパク質発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/well で播種し、48時間培養する。細胞を 0.2 mM 3-イソブチル-メチルキサンチン、0.05 % BSA および 20 mM HEPES を含むハンクスバッファー（pH 7.4）で洗浄する（以下、反応用バッファーと略記する）。その後 0.5 ml の反応用バッファーを加えて 30 分間培養器で保温する。反応用バッファーを除き、新

たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、1μMの本発明のペプチドまたは1μMの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した2μM フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを、細胞に加え、37℃で24分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはト
5 ップカウンターにより測定する。本発明のペプチド単独を添加した場合と、1μMの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

- 10 本発明のペプチドは、フォルスコリン刺激に基づくルシフェラーゼによる発光量の増加を抑制する。該抑制を回復させる化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（chloramphenicol acetyltransferase）
15 ）、β-ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子タンパク質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chrolamphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用い
20 て、β-ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

〔4〕本発明のタンパク質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、アラキドン酸代謝物を細胞外に放出する。この反応を利用して、本発明のペプチドの
25 本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

あらかじめ、標識したアラキドン酸を、本発明のタンパク質発現細胞に取り込ませておくことによって、アラキドン酸代謝物放出活性を、細胞外に放出された

標識されたアラキドン酸代謝物を測定することによって測定することができる。

具体的には、本発明のペプチドを、標識したアラキドン酸を含有する本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、標識したアラキドン酸を含有する本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、アラキドン酸代謝物の放出活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のペプチドによるアラキドン酸代謝物放出活性を阻害する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10 また、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させ、本発明のタンパク質発現細胞のアラキドン酸代謝物放出活性を公知の方法で調べることによりアゴニスト活性を示す化合物のスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明のタンパク質発現細胞を24穴プレートに 5×10^4 cell/well
15 1で播種し、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を $0.25 \mu\text{Ci/well}$ となるよう添加し、16時間後、細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハンクスバッファー (pH 7.4) (以下、反応用バッファーと略記する) で洗浄する。終濃度 $10 \mu\text{M}$ の本発明のペプチドまたは終濃度 $10 \mu\text{M}$ の本発明のペプチドおよび試験化合物を含む反応用バッファー $500 \mu\text{l}$
20 を、各wellに添加する。37℃で60分間インキュベートした後、反応液 $400 \mu\text{l}$ をシンチレーターに加え、反応液中に遊離した $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定する。

反応用バッファー $500 \mu\text{l}$ のみを添加した場合 (本発明のペプチド非添加・試験化合物非添加) の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を0%、 $1.0 \mu\text{M}$
25 の本発明のペプチドを含む反応用バッファーを添加した場合 (試験化合物非添加) の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を100%として、試験化合物を添加した場合の遊離 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量を算出する。

アラキドン酸代謝物放出活性が、例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

〔5〕本発明のタンパク質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、細胞内のCa濃度が上昇する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、細胞内カルシウム濃度上昇活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、本発明のペプチドによる細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみの添加による蛍光強度の上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明のタンパク質発現細胞を、滅菌した顕微鏡用カバーガラス上に播き、2日後、培養液を、4mM Fura-2 AM（同仁化学研究所）を懸濁したHBSSに置換し、室温で2時間30分おく。HBSSで洗浄した後、キュベットにカバーガラスをセットし、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、励起波長340nmおよび380nmでの、505nmの蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

また、FLIPR（モレキュラーデバイス社製）を使って行ってもよい。本発明のタンパク質発現細胞懸濁液にFluo-3 AM（同仁化学研究所製）を添加し、細胞に取り込ませた後、上清を遠心により数度洗浄後、96穴プレートに細胞を播く。FLIPR装置にセットし、Fura-2の場合と同様に、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

さらに、本発明のタンパク質発現細胞に、細胞内Caイオンの上昇によって発

光するようなタンパク質の遺伝子（例、aequorinなど）を共発現させておき、細胞内Ca²⁺イオン濃度の上昇によって、該遺伝子タンパク質（例、aequorinなど）がCa²⁺結合型となり発光することを利用して、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることもできる。

- 5 細胞内Ca²⁺イオンの上昇によって発光するようなタンパク質の遺伝子を共発現させた本発明のタンパク質発現細胞を、96穴プレートに播き、上記と同様に、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、蛍光強度の比の上昇を蛍光測定器で測定し、比較する。

- 本発明のペプチドによる蛍光強度の上昇を、抑制する試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

- 対照としてETA（エンドセリンAレセプター）発現CHO細胞24番クローン（以後ETA24細胞と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279巻、675-685頁、1996年参照）を用い、アッセイ用サンプルについて、ZACB1細胞（後述の実施例2）およびETA24細胞における細胞内Ca²⁺イオン濃度上昇活性の測定をFLIPR（モレキュラーデバイス社製）を用いて行う。ZACB1細胞、ETA24細胞共に10%透析処理済ウシ胎児血清（以後d FBSとする）を加えたDMEMで継代培養しているものを用いる。ZACB1細胞、ETA24細胞をそれぞれ 1.5×10^4 cells/mlとなるように培地（10% d FBS-DMEM）に懸濁し、FLIPR用96穴プレート（Black plate clear bottom, Coster社）に分注器を用いて各ウェルに200 μ lずつ植え込み（ 3.0×10^4 cells/200 μ l/ウェル）、5% CO₂インキュベーター中にて37℃で一晩培養した後用いる（以後、細胞プレートとする）。H/HBSS（ニッスイハンクス2（日水製薬株式会社）9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77g、水酸化ナトリウム溶液でpH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理）20 ml、250 mM Probenecid 200 μ l、ウシ胎児血清 (FBS) 200 μ lを混合する。また、Fluo 3-AM（同仁化学研究所）2バイアル（50 μ g）をジメチルスルフォキシド 40 μ l、20% Pluronic acid（Molecular Probes社）40 μ lに溶解し、これを上記H/HBSS-Probenecid-FBSに加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液

を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μ l ずつ分注し、5% CO₂ インキュベーター中にて 37℃ で 1 時間 インキュベートする（色素ローディング）。アッセイ用サンプル（各フラクション）に、2.5 mM Probenecid、0.1% CHAPS を含む H/HBSS 150 μ l を加えて希釈し、FLIPR 用 96 穴プレート（V-Bottom プレート、Costar 社）へ移す（以後、サンプルプレートとする）。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSS に 2.5 mM Probenecid を加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー（Molecular Devices 社）を用いて細胞プレートを 4 回洗浄し、洗浄後 100 μ l の洗浄バッファーを残す。この細胞プレートとサンプルプレートを FLIPR にセットしアッセイを行う（FLIPR により、サンプルプレートから 50 μ l のサンプルが細胞プレートへと移される）。

〔6〕レセプターを発現する細胞に、レセプターアゴニストを添加すると、細胞内イノシトール三リン酸濃度は上昇する。本発明のペプチドの、本発明のタンパク質発現細胞における細胞内イノシトール三リン酸産生活性を利用することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を变化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、標識したイノシトールの存在下、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、イノシトール三リン酸産生活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする。測定は公知の方法に従って行う。

本方法において、イノシトール三リン酸産生活性を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させ、イノシトール三リン酸産生上昇を測定することによってアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明のタンパク質発現細胞を 24 穴プレートに播き、1 日間培養する。その

後、myo-[2-³H] inositol (2.5 μ Ci/well) を添加した培地で1日間培養し、細胞を放射活性を有するイノシトールを無添加の培地でよく洗浄する。本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加後、10%過塩素酸を加え、反応を止める。1.5M 水酸化カリウムおよび60mM HEPES溶液で中和し、0.5mlのAG1x8樹脂 (Bio-Rad) を詰めたカラムに通し、5mM 四ホウ酸ナトリウム (Na₂B₄O₇) および60mM ギ酸アンモニウムで洗浄した後、1M ギ酸アンモニウムおよび0.1M ギ酸で溶出した放射活性を、液体シンチレーションカウンターで測定する。本発明のペプチドを添加しない場合の放射活性を0%、本発明のペプチドを添加した場合の放射活性を100%とし、試験化合物の、本発明のペプチドと本発明のタンパク質の結合に対する影響を算出する。

イノシトール三リン酸産生活性が、例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

〔7〕TRE-レポーター遺伝子ベクターを用いて、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

TRE (TPA response element) を含むDNAを、ベクターのレポーター遺伝子上流に挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターを得る。TRE-レポーター遺伝子ベクターを導入した本発明のタンパク質発現細胞において、細胞内カルシウム濃度の上昇を伴う刺激は、TREを介したレポーター遺伝子発現と、それに引き続くレポーター遺伝子の遺伝子産物 (タンパク質) の産生を誘導する。つまり、レポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を測定することにより、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入細胞内のカルシウム量の変動を検出することができる。

具体的には、本発明のペプチドを、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、TRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に

接触させた場合における、レポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

ベクターとしては、例えば、ピッカジーン ベイシックベクター、ピッカジーン エンハンサーベクター（東洋インキ製造（株））などが用いられる。TREを含むDNAを、上記ベクターのレポーター遺伝子、例えばルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクロニングサイトに挿入し、TRE-レポーター遺伝子ベクターとする。

本方法において、本発明のペプチドによるレポーター遺伝子タンパク質の酵素活性を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみをTRE-レポーター遺伝子ベクター導入本発明のタンパク質発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な発光量の増加を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼを利用する例を用いて、このスクリーニング方法の具体例を以下に述べる。

TRE-レポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）を導入した本発明のタンパク質発現細胞を、24穴プレートに 5×10^3 cell/wellで播種し、48時間培養する。細胞を0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むハanksバッファー（pH7.4）で洗浄した後、10nMの本発明のペプチドまたは10nMの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加し、37℃で60分間反応させる。細胞をピッカジーン用細胞溶解剤（東洋インキ製造（株））で溶かし、溶解液に発光基質（東洋インキ製造（株））を添加する。ルシフェラーゼによる発光は、ルミノメーター、液体シンチレーションカウンターまたはトップカウンターにより測定する。本発明のペプチドを添加した場合と、10nMの本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した場合のルシフェラーゼによる発光量を測定して、比較する。

本発明のペプチドによる細胞内カルシウムの上昇によって、ルシフェラーゼによる発光量が増加する。この増加を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物

質として選択することができる。

レポーター遺伝子として、例えば、アルカリフォスファターゼ、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase)、β-ガラクトシダーゼなどの遺伝子を用いてもよい。これらのレポーター遺伝子タンパク質の酵素活性は、公知の方法に従い、または市販の測定キットを用いて測定する。アルカリフォスファターゼ活性は、例えば和光純薬製Lumi-Phos 530を用いて、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ活性は、例えば和光純薬製FAST CAT chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kitを用いて、β-ガラクトシダーゼ活性は、例えば和光純薬製Aurora Gal-XEを用いて測定する。

〔8〕本発明のタンパク質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、MAPキナーゼが活性化され、増殖する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、細胞増殖を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本発明のタンパク質発現細胞の増殖は、例えば、MAPキナーゼ活性、チミジン取り込み活性、細胞数などを測定すればよい。

具体例としては、MAPキナーゼ活性については、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に添加した後、細胞溶解液から抗MAPキナーゼ抗体を用いた免疫沈降によりMAPキナーゼ分画を得た後、公知の方法、例えば和光純薬製MAP Kinase Assay Kitおよびγ-[³²P]-ATPを使用してMAPキナーゼ活性を測定し、比較する。

チミジン取り込み活性については、本発明のタンパク質発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、放射活性により標識したチミジン（例、[m e t h y l - ³ H] -チミジンなど）を加え、その後、細胞を溶解し、細胞内に取り込まれたチミジンの放射活性を、液体シンチレーションカウンターで計数することにより、
5 チミジン取り込み活性を測定し、比較する。

細胞数の測定については、本発明のタンパク質発現細胞を24穴プレートに播種し、培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を添加した後、MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) を添加する。細胞内に取り込まれてMTTが変化したMTTホルマザンを、塩酸にて酸性としたイソプロパノール水溶液で細胞を溶解した後、570 nmの吸収によって測定し、比較する。
10

本方法において、本発明のタンパク質発現細胞の増殖を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

15 一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞増殖活性を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

チミジン取り込み活性を利用するスクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

20 本発明のタンパク質発現細胞を24穴プレートに5000個/ウェル播き、1日間培養する。次に血清を含まない培地で2日間培養し、細胞を飢餓状態にする。本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を、細胞に添加して24時間培養した後、[m e t h y l - ³ H] -チミジンをウェル当たり0.015 MBq 添加し、6時間培養する。細胞をPBSで洗った後、メタノールを
25 添加して10分間放置する。次に5%トリクロロ酢酸を添加して15分間放置後、固定された細胞を蒸留水で4回洗う。0.3 N水酸化ナトリウム溶液で細胞を溶解し、溶解液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定する。

本発明のペプチドを添加した場合の放射活性の増加を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

〔9〕本発明のタンパク質発現細胞は、本発明のペプチドの刺激により、カリウムチャンネルが活性化し、細胞内にあるKイオンが、細胞外に流出する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を
5 変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

Kイオンと同族元素であるRbイオン（ルビジウムイオン）は、Kイオンと区別無く、カリウムチャンネルを通して細胞外に流出する。よって、本発明のタンパク質発現細胞に、放射活性同位体であるRb（ ^{86}Rb ）を取り込ませてお
10 いた後、本発明のペプチドの刺激によって流出する ^{86}Rb の流れ（流出活性）を測定することにより、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定する。

具体的には、 ^{86}Rb の存在下、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、 ^{86}Rb の流出活性を測定し、比
15 較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

本方法において、本発明のペプチド刺激による ^{86}Rb の流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる
20 。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な ^{86}Rb の流出活性の上昇を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

25 本発明のタンパク質発現細胞を24穴プレートに播き、2日間培養する。その後、 1mCi/ml の $^{86}\text{RbCl}$ を含む培地中で2時間保温する。細胞を培地でよく洗浄し、外液中の $^{86}\text{RbCl}$ を完全に除く。本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を細胞に添加し、30分後外液を回収し、 γ カウンタで放射活性を測定し、比較する。

本発明のペプチド刺激による⁸⁶Rbの流出活性の上昇を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

〔10〕本発明のタンパク質発現細胞が本発明のペプチドに反応し、細胞外のpHが変化する。この反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体的には、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質発現細胞に接触させた場合における、細胞外のpH変化を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

細胞外pH変化は、例えば、Cytosensor装置（モレキュラーデバイス社）を使用して測定する。

本方法において、本発明のペプチドによる細胞外pH変化を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質発現細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞外pH変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

本発明のタンパク質発現細胞をCytosensor装置用のカプセル内で終夜培養し、装置のチャンバーにセットして細胞外pHが安定するまで約2時間、0.1% BSAを含むRPMI 1640培地（モレキュラーデバイス社製）を灌流させる。pHが安定した後、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含む培地を細胞上に灌流させる。灌流によって生じた培地のpH変化を測定し、比較する。

本発明のペプチドによる細胞外pH変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

[11] 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のhaploid α -mating Type (MAT α) の性フェロモンレセプター S T e 2 は、Gタンパク質 G p a 1 と共役しており、性フェロモン α -mating factor に応答してMAPキナーゼを活性化し、これに引き続き、F a r 1 (cell-cycle arrest) および転写活性化因子 S t e 1 2 が
5 活性化される。S t e 1 2 は、種々のタンパク質 (例えば、接合に関与する F U S 1) の発現を誘導する。一方、制御因子 S s t 2 は上記の過程に抑制的に機能する。この系において、レセプター遺伝子を導入した酵母を作製し、レセプターアゴニストの刺激により酵母細胞内のシグナル伝達系を活性化し、その結果生じる増殖などを指標として用いる、レセプターアゴニストとレセプターとの反応の
10 測定系の試みが行なわれている (Trends in Biotechnology, 15巻, 487-494頁, 1997年)。上記のレセプター遺伝子導入酵母の系を利用して、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

具体例を以下に示す。

15 MAT α 酵母の S t e 2 および G p a 1 をコードする遺伝子を除去し、代わりに、本発明のタンパク質遺伝子および G p a 1 - G a i 2 融合タンパク質をコードする遺伝子を導入する。F a r をコードする遺伝子を除去してcell-cycle arrestが生じないようにし、また、S s t をコードする遺伝子を除去して本発明のペプチドに対する応答の感度を向上させておく。さらに、F U S 1 にヒスチジン
20 生合成遺伝子 H I S 3 を結合した F U S 1 - H I S 3 遺伝子を導入する。この遺伝子組換え操作は、例えば、Molecular and Cellular Biology, 15巻, 6188-6195頁, 1995年に記載の方法において、ソマトスタチンレセプタータイプ2 (SSTR2) 遺伝子を、本発明のタンパク質に置き換えて実施することができる。

このように構築された形質変換酵母は、本発明のペプチドに高感度で反応し、
25 その結果、MAPキナーゼの活性化が起き、ヒスチジン生合成酵素が合成されるようになり、ヒスチジン欠乏培地で生育可能になる。

従って、上記の本発明のタンパク質発現酵母 (S t e 2 遺伝子および G p a 1 遺伝子が除去され、本発明のタンパク質遺伝子および G p a 1 - G a i 2 融合タンパク質コード遺伝子が導入され、F a r 遺伝子および S s t 遺伝子が除去され

、FUS1-HIS3遺伝子が導入されたMAT α 酵母)を、ヒスチジン欠乏培地で培養し、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させ、該酵母の生育を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる

5 。

本方法において、該酵母の生育を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを上記の本発明のタンパク質発現酵母に接触させ、本発明のペプチドと同様な酵母の生育を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

10 スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

上記の本発明のタンパク質発現酵母を完全合成培地の液体培地で終夜培養し、その後、ヒスチジンを除去した溶解寒天培地に、 2×10^4 cell/mlの濃度になるように加える。ついで、 9×9 cmの角形シャーレに播く。寒天が固化した後、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物をしみこませた滅菌濾紙を寒天表面におき、 30°C で3日間培養する。試験化合物の影響は、濾紙の周囲の酵母の生育を、本発明のペプチドのみをしみこませた滅菌濾紙を用いた場合と比較する。また、あらかじめ、ヒスチジンを除去した寒天培地に本発明のペプチドを添加しておき、滅菌濾紙に試験化合物のみをしみこませて酵母を培養し、シャーレ全面での酵母の生育が濾紙の周囲で影響を受けることを観察してもよい。

20 酵母の生育を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

25 [12] 本発明のタンパク質遺伝子RNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、本発明のペプチドによって刺激すると細胞カルシウム濃度が上昇して、calcium-activated chloride currentが生じる。これは、膜電位の変化としてとらえることができる(Kイオン濃度勾配に変化がある場合も同様)。本発明のペプチドによって生じる本発明のタンパク質導入アフリカツメガエル卵母細胞にお

る上記反応を利用して、本発明のペプチドの本発明のタンパク質発現細胞に対する刺激活性を測定することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることができる。

5 具体的には、本発明のペプチドを、本発明のタンパク質遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合と、本発明のペプチドおよび試験化合物を、本発明のタンパク質遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させた場合における、細胞膜電位の変化を測定し、比較することにより、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする。

10 本方法において、細胞膜電位変化を抑制する試験化合物を、拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

一方、試験化合物のみを本発明のタンパク質遺伝子RNA導入アフリカツメガエル卵母細胞に接触させ、本発明のペプチドと同様な細胞膜電位変化を測定することによりアゴニストのスクリーニングを行なうこともできる。

15 スクリーニング法の一具体例を以下に述べる。

氷冷して動けなくなった雌のアフリカツメガエルから取り出した、卵母細胞塊を、MBS液 (88mM NaCl, 1mM KCl, 0.41mM CaCl₂, 0.33mM Ca(NO₃)₂, 0.82mM MgSO₄, 2.4mM NaHCO₃, 10mM HEPES; pH7.4) に溶かしたコラーゲナーゼ (0.5 mg/ml) で卵塊がほぐれるまで19℃、1~6時間、150rpmで処理する。
20 外液をMBS液に置換することで3度洗浄し、マイクロマニピュレーターで本発明のタンパク質遺伝子poly A付加cRNA (50ng/50nl) を卵母細胞にマイクロインジェクションする。

本発明のタンパク質遺伝子mRNAは、組織や細胞から調製してもよく、プラスミドからin vitroで転写してもよい。本発明のタンパク質遺伝子mRNAをMBS液中で20℃で3日培養し、これをRinger液を流しているvoltage clamp装置のくぼみに置き、電位固定用ガラス微小電極および電位測定用ガラス微小電極を細胞内に刺入し、(ー)極は細胞外に置く。電位が安定したら、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドおよび試験化合物を含むRinger液を流して電位変化を記録する。試験化合物の影響は、本発明のタンパク質遺伝子RNA導入アフリ

カツメガエル卵母細胞の細胞膜電位変化を、本発明のペプチドのみ含むRinger液を流した場合と比較することによって測定することができる。

細胞膜電位変化を抑制する化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

- 5 上記の系において、電位の変化量を増大させると、測定しやすくなるため、各種のGタンパク質遺伝子のpoly A付加RNAを導入してもよい。また、カルシウム存在下で発光を生じるようなタンパク質（例、aequorinなど）の遺伝子のpoly A付加RNAを共インジェクションすることにより、膜電位変化ではなく発光量を測定することもできる。

- 10 本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、本発明のタンパク質を含有する細胞、あるいは本発明のタンパク質を含有する細胞の膜画分、および本発明のペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものがあげられる。

- 15 1. スクリーニング用試薬

(i) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

- 20 孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

(ii) 本発明のタンパク質の標品

本発明のタンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

(iii) 標識リガンド

- 25 [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した本発明のペプチド

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

(iv) リガンド標準液

本発明のペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

(i) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のタンパク質を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

(ii) $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識した本発明のペプチドを5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3} Mの本発明のペプチドを5 μ l加えておく。

(iii) 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識した本発明のペプチドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

(iv) 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合を変化させる（結合を阻害または促進する）化合物であり、具体的には本発明のタンパク質を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明のタンパク質のアゴニスト（ZAQアゴニスト））、または該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明のタンパク質のアンタゴニスト（ZAQアンタゴニスト））である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化

合物、発酵生産物などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記本発明のタンパク質のアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(A)または(B)に従えばよい。

- 5 (A) 前記のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した本発明のタンパク質を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアンタゴニストである。

(B) (a) 試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させ、上記本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアゴニストである。

- 15 (b) 本発明のタンパク質を活性化する化合物（例えば、本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質のアゴニストなど）を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のタンパク質を活性化する化合物および試験化合物を本発明のタンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、本発明のタンパク質を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明のタンパク質を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明のタンパク質のアンタゴニストである。

該本発明のタンパク質のアゴニストは、本発明のタンパク質に対する本発明のペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

- 25 逆に、本発明のタンパク質アンタゴニストは、本発明のタンパク質に対する本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

上述のように、本発明のペプチドは腸管の収縮などを制御する活性などを有することから、例えば、消化器疾患（例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病

など) など、好ましくは消化器疾患などの疾病の治療・予防剤等の医薬として使用することができるため、上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物のうち、本発明のタンパク質のアゴニスト (Z A Q アゴニスト) は、例えば、消化器疾患 (例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患 (例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など) など、好ましくは消化器疾患などの疾病の治療・予防剤などとして用いることができる。また、本発明のタンパク質のアンタゴニスト (Z A Q アンタゴニスト) は、例えば、消化器疾患 (例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患 (例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など) など、好ましくは消化器疾患などの疾病の治療・予防剤などとして用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジンジールアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩などがあげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアス

パラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のペプチドを医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

- 5 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。
- 10 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤
- 15 などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。
- 20 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80TM、HCO-5
- 25

0)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1から1000mg、好ましくは約1.0から300mg、より好ましくは約3.0から50mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の消化器疾患患者（体重60kgとして）への投与においては、ZAQアンタゴニストを一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

（3）本発明のペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量等を使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチドの割合を測定する

ことを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のペプチドの定量法を提供する。

- 5 また、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のペプチドの定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。
- 10 本発明の抗体を用いる本発明のペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、本発明のペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法
- 15 、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質等が用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ 等が用いられる。上記酵素と

- 20 としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等が用いられる。発光物質としては、例えば、
- 25 ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等が用いられる。
- さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化にあたっては、物理吸着を用いてもよく、また通常ペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース等の不溶

性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のペプチド量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のペプチドの測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のペプチドのＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリー等に用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体等を用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用地第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗

体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー等が好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書等を参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、
入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治
ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免
15 疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫
測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」
Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical
Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques (Part C))、
同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part D:Selected Immunoassays))、
20 同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part E:Monoclonal Antibodies and
General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques
(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミ
ックプレス社発行)等を参照することができる。

25 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のペプチドを感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のペプチドの濃度を定量することによって、（１）本発明のペプチドの濃度の増多が検出された場合、例えば、消化器疾患（例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）など、好ましくは消化

器疾患などに罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、(2) 本発明のペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、消化器疾患(例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)など、好ましくは消化器疾患などに罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織等の被検体中に存在する本発明のペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のペプチドの検出、被検細胞内における本発明のペプチドの挙動の分析等のために使用することができる。

(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等)における本発明のペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多等の遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879頁(1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁(1989年))、DNAマイクロアレイ等により実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションやDNAマイクロアレイにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法やDNAマイクロアレイによりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、消化器疾患(例、腸炎、下痢、便秘

、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）など、好ましくは消化器疾患などに罹患している可能性が高いと診断することができる。

（５）アンチセンスDNAを含有する医薬

- 5 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、生体内における本発明のペプチドまたは本発明のDNAの機能を抑制することができるので、例えば、本発明のペプチドの発現過多に起因する疾患（例えば、消化器疾患（例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）など、好ましくは消化器疾患など）の治療・予防剤として使用することができる。
- 10

上記アンチセンスDNAを上記の治療・予防剤として、前記した本発明のDNAを含有する各種疾病の治療・予防剤と同様に使用することができる。

- 15 例えば、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター等の適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って投与することができる。該アンチセンスDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のために補助剤等の生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

- 20 さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

さらに、本発明は、

- (i) 本発明のペプチドをコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、
- 25 (ii) 前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
- (iii) 本発明のペプチドをコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
- (iv) 前記リボザイムを含有してなる医薬も提供する。

上記アンチセンスヌクレオチドと同様に、二重鎖RNA（RNAi；RNA interference法）、リボザイムなども、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチド

(例、DNA)の発現を抑制することができ、生体内における本発明のペプチドまたはDNAの機能抑制することができるので、例えば消化器疾患(例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)など、好ましくは消化器疾患などの予防

5 ・治療剤などとして使用することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法(例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法(例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年)に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のペプチドをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分(RNA断片)が挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合は、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

(6) 本発明の抗体を含有する医薬および診断薬

本発明のペプチドの活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、本発明のペプチドの発現過多に起因する疾患(例えば、消化器疾患(例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など)、中枢神経疾患(例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など)など、好ましくは消化器疾患など)の治療・予防剤等の医薬として、あるいは本発明のペプチドの発現過多に起因する疾患(例えば、消化器疾患(例、腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など))の診断薬として使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは非ヒト哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルー

ト等によっても異なるが、例えば、消化器疾患治療の目的で本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウム等が用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用

いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤等が例示され、それぞれ5の投薬単位剤形当たり通常5～500mg程度、とりわけ注射剤では5～1000mg程度、その他の剤形では10～250mg程度の上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生10じない限り他の活性成分を含有してもよい。

(7) 本発明のDNAを有する非ヒト動物の作出

本発明のDNAを用いて、本発明のタンパク質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば15、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いる20のが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを導入させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のタンパク質等を高産生するDNA導入動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス25由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの導入は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞

において本発明のタンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のタンパク質等を有する。

- 5 本発明のDNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

- 10 本発明のDNAが導入された動物は、本発明のタンパク質等が高発現させられているので、本発明のタンパク質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

- 本発明のDNA導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のタンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のタンパク質等について分析することができる。本発明のタンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のタンパク質等を単離精製することも可能である。
- 15
20

(8) ノックアウト動物

- 25 本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- 1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝

- 子)を導入することにより不活性化された上記1)記載の胚幹細胞、
- 3) ネオマイシン耐性である上記1)記載の胚幹細胞、
- 4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記1)記載の胚幹細胞、
- 5) ゲッ歯動物がマウスである上記4)記載の胚幹細胞、
- 5 6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- 7) 該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記6)記載の非ヒト哺乳動物、
- 8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記6)記載の非ヒト哺乳動物、
- 10 9) ゲッ歯動物がマウスである上記8)記載の非ヒト哺乳動物、および
- 10) 上記7)記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。

20 非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子

を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいは *lacZ* (β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、*cat* (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列 (5 例えば、*polyA*付加シグナルなど) を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖 (以下、ターゲッティングベクターと略記する) を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。 10

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が 15 明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス (C57BL/6とDBA/2とのF₁) を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロス 20 することでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-1000$ U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約 37°C で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり（M. J. Evans及びM. H. Kaufman

an, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年 ; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年 ; T. C. Doetschman
ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モル
5 フロジー、第87巻、27頁、1985年]、本発明のES細胞を分化させて得られる
本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のペプチドの細胞生
物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別する
10 ことが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配
15 列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の
本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAを
ノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはター
20 ゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用した
マウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた
場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をク
ローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚ま
25 たは胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮
に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変
異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての

組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のペプチドのヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のペプチドのホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のペプチドにより誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のペプチドの生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

(7 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を
5 投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 10 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し
15 、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

- 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質など
20 にあわせて適宜選択することができる。

- 例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）など、好ましくは消化器疾患に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、
25 該動物の拘束ストレスに対する排便量変化を経時的に測定する。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニン

グで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

- 10 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 15 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60 kgとして）の消化器疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、
20 対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60 kgとして）の消化器疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

25

（7b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプ

ロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のペプチドの発現する組織で、本発明のペプチドの代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -ガラクトピラノシド (X-gal) のような β -ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、 β -ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性

を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸など）や塩基（例、有機酸など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のペプチドの発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）など、好ましくは消化器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のペプチドの発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）、中枢神経疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）など、好ましくは消化器疾患などの予防・治療剤などの医薬として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する

化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の消化器疾患患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の消化器疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の消化器疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の消化器疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のDNAのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現

するような細胞株を樹立すれば、本発明のペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

- 5 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

10	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
15	C	: シトシン
	Y	: チミンまたはシトシン
	N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
	R	: アデニンまたはグアニン
	M	: シトシンまたはアデニン
20	W	: チミンまたはアデニン
	S	: シトシンまたはグアニン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
25	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	GlyまたはG	: グリシン

	A l a	またはA	: アラニン
	V a l	またはV	: バリン
	L e u	またはL	: ロイシン
	I l e	またはI	: イソロイシン
5	S e r	またはS	: セリン
	T h r	またはT	: スレオニン
	C y s	またはC	: システイン
	M e t	またはM	: メチオニン
	G l u	またはE	: グルタミン酸
10	A s p	またはD	: アスパラギン酸
	L y s	またはK	: リジン
	A r g	またはR	: アルギニン
	H i s	またはH	: ヒスチジン
	P h e	またはF	: フェニルアラニン
15	T y r	またはY	: チロシン
	T r p	またはW	: トリプトファン
	P r o	またはP	: プロリン
	A s n	またはN	: アスパラギン
	G l n	またはQ	: グルタミン
20	p G l u		: ピログルタミン酸
	X a a		: 未同定アミノ酸残基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬等を下記の記号で表記する。

25	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	A c	: アセチル基

	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Bzl	: ベンジル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
5	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロルベンジルオキシカルボニル
	Cl ₂ Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
10	HOBT	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	PAM	: フェニルアセトアミドメチル
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
15	DNP	: ジニトロフェニル
	Bum	: ターシャリーブトキシメチル
	Trt	: トリチル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
20	MeBzl	: 4-メチルベンジル
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	NMP	: N-メチルピロリドン
	HONB	: N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボ キシイミド
25	NMP	: N-メチルピロリドン
	TFA	: トリフルオロ酢酸
	CHAPS	: 3-[(3-コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ] - 1-プロパンスルホナート

- PMSF : フェニルメチルスルホニルフルオリド
- GDP : グアノシン-5'-ニリン酸
- 5 Fura-2AM : 1-[6-アミノ-2-(5-カルボキシ-2-オキサ
ゾリル)-5-ベンゾフラニロキシ]-2-(2-アミ
ノ-5-メチルフェノキシ)-エタン-N, N, N', N'
-四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル
- 10 Fluo-3AM : 1-[2-アミノ-5-(2, 7-ジクロロ-6-ヒド
ロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)フェノキシ]
-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-
N, N, N', N'-四酢酸ペンタアセトキシメチルエス
テル
- HEPES : 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニ
ル]エタンスルホン酸
- EDTA : エチレンジアミン四酢酸
- 15 SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
- BSA : ウシ血清アルブミン
- HBSS : ハンクス平衡塩液
- EIA : エンザイムイムノアッセイ
- 20 本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。
- [配列番号：1]
- ヒト脳由来タンパク質ZAQのアミノ酸配列を示す。
- [配列番号：2]
- ヒト脳由来タンパク質ZAQをコードするDNAの塩基配列を示す(ZAQC
- 25)。
- [配列番号：3]
- ヒト脳由来タンパク質ZAQをコードするDNAの塩基配列を示す(ZAQT
-)。
- [配列番号：4]

後述の実施例 3 で用いられたプライマー 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

- 5 ヒト型 I 5 E レセプタータンパク質をコードする DNA の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - F 1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - R 1 の塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：9〕

後述の実施例 3 で得られた DNA 断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - R 2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

- 15 後述の実施例 3 で得られたヒト型 B v 8 ペプチドをコードする DNA の 5' 端塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - W F の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

- 20 後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - W R の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - C F の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

後述の実施例 3 で用いられたプライマー h B v 8 - S R の塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：16〕

後述の実施例 3 で得られた DNA 断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

ヒト型 B v 8 前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

ヒト型B v 8 前駆体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

ヒト型B v 8 成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

- 5 ヒト型B v 8 成熟体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

ヘビ毒MIT1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

ヒト型B v 8 成熟体ペプチドのC末端のLys欠損体のアミノ酸配列を示す。

- 10 〔配列番号：23〕

後述の実施例5で用いられたプライマーBF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

後述の実施例5で用いられたプライマーBR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

- 15 後述の実施例5で得られたDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRB5-1の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRB5-3の塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：28〕

後述の実施例5で得られたラット型B v 8をコードするDNAの5'端塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRB3-1の塩基配列を示す。

- 25 〔配列番号：30〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRB3-2の塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

後述の実施例5で得られたラット型B v 8をコードするDNAの3'端塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRBv8-WF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRBv8-WF2の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：34〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRBv8-WR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

後述の実施例5で用いられたプライマーRBv8-WR2の塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

10 後述の実施例5で得られたDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

ラット型Bv8前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：38〕

ラット型Bv8前駆体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：39〕

ラット型Bv8成熟体ペプチドおよびマウス型Bv8成熟体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：40〕

ラット型Bv8成熟体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：41〕

後述の実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

後述の実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

25 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（rZAQ1）をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（rZAQ1）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：45〕

後述の実施例7で用いられたプローブ1の塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

後述の実施例7で用いられたプローブ2の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：47〕

後述の実施例7で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

後述の実施例7で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

10 後述の実施例7で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（rZAQ2）をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：51〕

15 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（rZAQ2）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：52〕

ヒト型I5Eレセプタータンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：53〕

20 マウス由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（GPR73）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：54〕

マウス由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（mI5E）のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：55〕

マウス型Bv8前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：56〕

マウス型Bv8前駆体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕

マウス型B v 8 成熟体ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：58]

後述の実施例1で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

[配列番号：59]

- 5 後述の実施例1で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。

[配列番号：60]

後述の実施例1で用いられたZ A Q p r o b eの塩基配列を示す。

[配列番号：61]

後述の実施例1で用いられたプライマーZ A Q C S a lの塩基配列を示す。

- 10 [配列番号：62]

後述の実施例4で用いられたプライマーZ A Q C S p eの塩基配列を示す。

[配列番号：63]

マウス由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（G P R 7 3）をコードする塩基配列を示す。

- 15 [配列番号：64]

マウス由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質（m I 5 E）をコードする塩基配列を示す。

[配列番号：65]

参考例1で用いられたDNA断片#1の塩基配列を示す。

- 20 [配列番号：66]

参考例1で用いられたDNA断片#2の塩基配列を示す。

[配列番号：67]

参考例1で用いられたDNA断片#3の塩基配列を示す。

[配列番号：68]

- 25 参考例1で用いられたDNA断片#4の塩基配列を示す。

[配列番号：69]

参考例1で用いられたDNA断片#5の塩基配列を示す。

[配列番号：70]

参考例1で用いられたDNA断片#6の塩基配列を示す。

〔配列番号：71〕

配列番号：30で表わされるヒト型Bv8をコードする合成DNAの塩基配列を示す。

- 5 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR2.1-ZAQCは、平成11(1999)年8月23日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 通商産業省 工業技術院 生命工学技術研究所 (NIBH))に受託番号FERM BP-6855として、平成11(1999)年8月4日から、日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686) 財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16301として寄託されている。

- 15 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR2.1-ZAQTは、平成11(1999)年8月23日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH))に受託番号FERM BP-6856として、平成11(1999)年8月4日から財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16302として寄託されている。

- 20 後述の実施例5で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pRBvは、平成13(2001)年1月11日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 経済産業省 産業技術総合研究所 生命工学工業技術研究所 (NIBH))に受託番号FERM BP-7427として、2000年12月22日から財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16522として寄託されている。

後述の実施例6で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR2.1-rZAQ1は、平成12(2000)年8月21日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8

566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に受託番号 FERM BP-7275 として、平成12(2000)年8月1日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に受託番号 IFO 16459 として寄託されている。

- 5 後述の実施例7で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH10B/pCMV-rZAQ2は、平成12(2000)年8月21日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に受託番号 FERM BP-7276 として、平成12(2000)年8月1日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に受託番号 IFO 16460 として寄託されている。
- 10

- 後述の参考例1で得られたエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) /pTCh2ZAQは、平成13(2001)年4月27日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-7572 として、平成13(2001)年3月15日から財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号 IFO 16587 として寄託されている。
- 15

実施例

- 20 以下に実施例および参考例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

- 25 実施例1 Gタンパク質共役型レセプタータンパク質ZAQをコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定およびZAQの発現分布の解析

(1) Gタンパク質共役型レセプタータンパク質ZAQをコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳下垂体cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライ

マー1 (5'- GTC GAC ATG GAG ACC ACC ATG GGG TTC ATG G -3' ;
配列番号 : 4) 及びプライマー2 (5'- ACT AGT TTA TTT TAG TCT GAT
GCA GTC CAC CTC TTC -3' ; 配列番号 : 5) を用いてPCR反応を行った。
該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し
5 、 Advantage2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1及び
プライマー2を各0.2 μ M, dNTPs 200 μ M、及び酵素に添付のバッファーを加え
、 25 μ lの液量とした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ C・2分の後、94 $^{\circ}$ C・20秒、7
2 $^{\circ}$ C・100秒のサイクルを3回、94 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・100秒のサイク
ルを3回、94 $^{\circ}$ C・20秒、64 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・100秒のサイクルを3
10 8回繰り返し、最後に68 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応
産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクタ
ーpCR2.1 (Invitrogen社) ヘサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導
入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した
後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプター
15 タンパク質をコードする2種類のcDNA配列ZAQC (配列番号 : 2) 及びZ
AQT (配列番号 : 3) を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列を
有するタンパク質はいずれも同一配列 (配列番号 : 1) を有したためZAQと命
名し、配列番号 : 2 で表されるDNAを含有する形質転換体が大腸菌 (*Escheric*
hia coli) DH5 α /pCR2.1-ZAQと、配列番号 : 3 で表されるDN
20 Aを含有する形質転換体が大腸菌DH5 α /pCR2.1-ZAQTと命名した
。

(2) Taqman PCRによるZAQの発現分布の解析

Taqman PCRに用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0
25 (PEバイオシステムスジャパン) を用いて検索し、プライマー3 (5'- TCATGTTGC
TCCACTGGAAGG - 3' (配列番号 : 58))、プライマー4 (5'-CCAATTGTCTTGAGGTC
CAGG-3' (配列番号 : 29))、ZAQprobe (5' - TTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCA
G - 3' (配列番号 : 60)) を選択した。プローブのリポーター色素として、FA
M (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダードDNAとして、pAK-ZAQを鋳型に、プライマーZAQ Sal (5'- GTCG ACATGGAGACCACCATGGGGTTCATGG- 3' (配列番号: 61)) およびZAQ Spe (5'- ACTAGTTTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTC - 3' (配列番号: 62))を用いて増幅したPCR断片を、CHROMA SPIN200 (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA, USA))を用いて精製し、 10^0-10^6 コピー/ μ lに調整して使用した。各組織の cDNAソースとして、Human Multiple Tissue cDNA Panel IおよびPanel II (CLONTECH Laboratories, Inc.)を使用した。プライマー、プローブ、鋳型に、Taqman Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムスジャパン)を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PEバイオシステムズジャパン)でPCR反応および解析をおこなった。

結果を図8および表1に示した。主に精巣、ついで肺、脳等の部位でZAQの発現がみられた。

表 1

15

組織	ZAQ (コピー数/ μ l)
脳	6.1
心臓	2.9
腎臓	2.8
肝臓	2.6
肺	7.0
脾臓	2.1
胎盤	3.2
骨格筋	2.6
大腸	1.8
卵巣	3.4
白血球	0.0
前立腺	0.7
小腸	2.2
脾臓	2.1
精巣	28.0
胸腺	1.1

実施例2 レセプター安定発現CHO細胞の作製

(2-1) ZAQ安定発現細胞株の作製

ZAQ安定発現細胞株は以下のようにして調製した。すなわち、実施例1で得たD
H5 α /pCR2.1-ZAQCの1クローンを、アンピシリンを含むLB培地で振とう培養し
、プラスミドpCR2.1-ZAQCを得た。これを制限酵素Sal IおよびSpe Iで処理し、
ZAQCをコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素Sal IおよびSpe
5 Iで処理したpAKK0-1.11H (Biochemica et Biophysica Acta 1219 (1994) 251-
259) と、該インサート部分をLigation Express Kit (CLONTECH Laboratories
, Inc. (CA, USA)) を用いて連結し、大腸菌DH10Bにエレクトロポレーション
法にて導入した。得られたクローンの有するプラスミドの構造を、制限酵素処
理ならびに配列解析で確認し、正しい構築のものをCHO細胞発現用プラスミドpAK
10 -ZAQCとして使用した。

このプラスミドpAK-ZAQCをCHO/dhfr⁻細胞 (American Type Culture Collecti
on) にCellPfect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて
形質導入することにより取得した。まず、蒸留水120 μ lに溶解したプラスミドD
NA 4 μ gに対してBuffer A (CellPfect Transfection Kitに添付) 120 μ lを添
15 加し、攪拌し、10分間静置後、Buffer B (CellPfect Transfection Kitに添付)
240 μ lを添加し、激しく攪拌し該DNAを含有するDNA-リン酸カルシウム複合
体を形成させた。5 x 10⁵個のCHO/ dhfr⁻細胞を60 mmシャーレに播き、10%の
ウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 社) を含む Ham's F-12培地 (日水製薬株式会社
) 中で37℃、5%炭酸ガス中で1日間培養した後、該DNA-リン酸カルシウム
20 複合体の懸濁液480 μ l をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37℃、5
%炭酸ガス中にて6時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12培地で2回細
胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15%グリセロールを含む緩衝液 (140 mM NaC
l, 25 mM HEPES, 1.4 mM Na₂PO₄, pH7.1) 1.2mlを添加し2分間処理した。これ
を、再度、血清を含まないHam's F-12培地で2回洗浄した後、10%のウシ胎児血
25 清を含む Ham's F-12培地中で37℃、5%炭酸ガス中で一晩培養した。該細胞をト
リプシン処理により分散させてシャーレから回収し、2 x 10⁴ 個ずつ6-well pla
teに植え込み、透析済み10%ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社)、1 mM MEM非
必須アミノ酸溶液 (大日本製薬株式会社)、100 units/ml Penicillin、100 μ g
/ml Streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (日

水製薬株式会社) 中にて37℃、5%炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始1日目、および2日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始8-10日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約2
5 1個選んだ。それぞれ選択された細胞からRNAを市販のRNA単離用キットを用いて回収し、以降、公知のRT-PCR法によりZAQを高発現するZAQ発現CHO細胞B-1番クローン(以後、ZAQC-B1細胞と略称する)を選別した。

(2-2) I5E安定発現細胞株の作製

ヒトI5EレセプターcDNA(配列番号: 6)を公知のPCR法によりクローニング
10 グし、pAKK01.11H発現ベクターに組み込んだ。該発現ベクターを(2-1)に記載した方法によりCHO/dhfr細胞(American Type Culture Collection)に形質導入した。培養開始10-14日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約20個選んだ。選択した細胞を 3×10^4 個/wellで96穴プレートに植え込み、ヘビ毒MIT1(配列番号: 21)に対する反応性を、後述の(2-3)に記載する試験方法により検討し、反応性の良いI5E発現CHO細胞4番クローン(以後、I5E-4細胞と略称する)を選別した。
15

(2-3) レセプター活性化作用の測定

上記(2-1)で得られたZAQC-B1細胞、および上記(2-2)で得られたI5E-4細胞を、それぞれ 15×10^4 cells/mlとなるように培地(10% d FBS-DMEM)に
20 懸濁し、FLIPR用96穴プレート(Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μ lずつ植え込み(3.0×10^4 cells/200 μ l/ウェル)、5% CO₂インキュベーター中にて37℃で一晩培養した後用いた(以後、細胞プレートとする)。H/HBSS(ニッスイハックス2(日水製薬株式会社) 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g、6 M水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理) 20 ml、250 mM Probenecid 200 μ l、ウシ胎児血清(FBS) 200 μ lを混合した。また、Fluo 3-AM(同仁化学研究所) 2バイアル
25 (50 μ g)をジメチルスルフォキシド 40 μ l、20% Pluronic acid(Molecular Probes社) 40 μ lに溶解し、これを上記H/HBSS-Probenecid-FBSに加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μ l

ずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中にて37℃で1時間インキュベートした（色素ローディング）。ヘビ毒MIT1を2.5 mM Probenecid、0.2% BSAを含むH/HBSS 150 μ lを加えて希釈し、FLIPR用96穴プレート（V-Bottomプレート、Coster社）へ移した（以後、サンプルプレートとする）。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5 mM Probenecidを加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー（Molecular Devices社）を用いて細胞プレートを4回洗浄し、洗浄後100 μ lの洗浄バッファーを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットし（FLIPRにより、サンプルプレートから50 μ lのサンプルが細胞プレートへと移される）、蛍光強度変化を継続的に測定することにより、細胞内Caイオン濃度上昇活性を測定した。

実施例3 ヒト型Bv8ペプチドの作製

（3-1）ヒト型Bv8ペプチド cDNAのクローニング

ヒト精巣Marathon-Ready cDNA（CLONTECH社）を鋳型として、プライマー hBv8-F1（配列番号：7）及びプライマー hBv8-R1（配列番号：8）を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

hBv8-F1: 5'-CTACTTCTGCTGCTGCCGCTGCTGTT-3'（配列番号：7）

hBv8-R1: 5'-TTGGAAGTTGAGGAAGCAAGAGCATTT-3'（配列番号：8）

PCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix（CLONTECH社）を1 μ l、添付の10x Advantage 2 PCR buffer（400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μ g/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40）を5 μ l、dNTP mixture（2.5 mM each, 宝酒造）を4 μ l、10 μ MプライマーhBv8-F1及びhBv8-R1を1 μ l、鋳型cDNAを5 μ l、及び蒸留水を33 μ lを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-68℃・1分のサイクル反応を35回、および68℃・1分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片を、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen社）を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：9で表される配列を得た。

ヒト精巣Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、プライマー hBv8-R2 (配列番号: 10) を作成し、以下に記した5' RACE実験を実施した。

hBv8-R2: 5' -TGTCTCCAGTTTGCCCATAGGTGTGC-3' (配列番号: 10)

5' RACEのPCR反応液は50X Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1
5 μ l、添付の5x Advantage-GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc,
17.5 mM Mg(OAc)₂, 25% Dimethyl Sulfoxide, 18.75 μ g/ml BSA, 0.025% Tween-
20, 0.025% Nonidet-P40)を10 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4
 μ l、10 μ MプライマーhBv8-R1を1 μ l、10 μ MプライマーAP1 (プライマーAP1
はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型cDNA (CL
10 ONTECH社、ヒト精巣Marathon-Ready cDNA)を5 μ l、及び蒸留水を28 μ lを混合
して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-72℃・3分のサイク
ル反応を10回、94℃・30秒-70℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・3分
のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X
15 Advantage-GC 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l、添付の5x Advantage-
GC 2 PCR buffer (200 mM Tricine-KOH, 75 mM KOAc, 17.5 mM Mg(OAc)₂, 25% D
imethyl Sulfoxide, 18.75 μ g/ml BSA, 0.025% Tween-20, 0.025% Nonidet-P40)
を10 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μ l、10 μ MプライマーhB
v8-R2を1 μ l、10 μ MプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-
20 Ready cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型DNA (該PCR反応液50倍希釈液)を5
 μ l、及び蒸留水を28 μ lを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性
後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回行った。

得られたDNA断片を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマ
ニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA
25 の塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、5' 端の配列 (配列番号: 1
1) を得た。

得られた配列番号: 9 及び配列番号: 11 の情報より、プライマー hBv8-WF (配列番号: 12)、プライマー hBv8-WR (配列番号: 13)、プライマー hBv8-CF (配列番号: 14) 及びプライマー hBv8-SR (配列番号: 15) を作成し、以

下に記したPCR反応を実施した。

hBv8-WF: 5'-CCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCC-3' (配列番号: 1 2)

hBv8-WR: 5'-CTATTCACATTTGGTTTCTACTC-3' (配列番号: 1 3)

hBv8-CF: 5'-GTCGACCACCATGAGGAGCCTGTGCTGCG-3' (配列番号: 1 4)

5 hBv8-SR: 5'-ACTAGTCGATTACTTTTGGGCTAAAC-3' (配列番号: 1 5)

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1 μ l、添付の10x PCR bufferを5 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを4 μ l、10 μ MプライマーhBv8-WF及びhBv8-WRを各2.5 μ l、鋳型DNA (ヒト精巣Marathon-Ready cDNA、CLONTECH社)を鋳型として5 μ l、及び蒸留水を30 μ lを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃1分-65℃・1分-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を1 μ l、添付の10x PCR bufferを5 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを4 μ l、10 μ MプライマーhBv8-CF及びhBv8-SRを各2.5 μ l、鋳型DNAを1 μ l、及び蒸留水を34 μ lを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・1分-65℃・1分-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号: 1 6で表される346 bpの塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号: 1 6で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpHBvと命名した。プラスミドpHBvにより大腸菌 (Escherichia coli) をトランスフォームさせ、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pHBvと命名した。

25 このDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号: 1 6で表わされるDNA断片は、配列番号: 1 7で表わされるヒト型Bv8前駆体ペプチド(108アミノ酸残基)をコードするDNA (配列番号: 1 8)を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号: 1 8で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号: 1 8で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号: 1 9で

表わされるヒト型B ν 8成熟体ペプチド(81アミノ酸残基)をコードする243塩基対からなるDNA(配列番号:20)を含んでいることが明らかとなった。

(3-2) ヒト型B ν 8ペプチド発現CHO細胞の樹立

上記(3-1)に記載したプラスミドpHB ν から、インサートcDNAをSal I及びSpe I制限酵素を用いて切り出しpAKK01.11H発現ベクターに組み込んだ。該プラスミドをCHO/dhFr $^{-}$ 細胞(American Type Culture Collection)にCellPfect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を用いて形質導入することにより取得した。はじめに、蒸留水300 μ lに溶解したプラスミドDNA 10 μ gに対してBuffer A (CellPfect Transfection Kitに添付) 120 μ lを添加後攪拌した。10分間静置後、Buffer B (CellPfect Transfection Kitに添付) 240 μ lを添加し、激しく攪拌し該DNAを含有するDNA-リン酸カルシウム複合体を形成させた。4 x 10⁵個のCHO/ dhFr $^{-}$ 細胞を60 mmシャーレに植え込み、10%のウシ胎児血清(BIO WHITTAKER 社)とMEM用非必須アミノ酸を含む Ham's F-12培地(日水製薬株式会社)中で37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス中で1日間培養した後、該複合体をシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス中にて7時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12培地で2回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15%グリセロール3 mlを添加し2分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で2回洗浄した後、10%のウシ胎児血清を含む Ham's F-12培地中で37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス中で15時間培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、1.25 x 10⁴個ずつ6穴プレートに植え込み、透析済み10%ウシ胎児血清(JRH BIOSCIENCES 社)、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycinを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地(日水製薬株式会社)中にて37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、2日毎に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始10-14日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを29個選択した。それぞれ選択された細胞を24穴プレートに植え込み、細胞がコンフルエントになった後、培地を10%ウシ胎児血清(JRH BIOSCIENCES 社)、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycinを含む

Dulbecco's modified Eagle medium 培地 (Phenol Red 不含、GIBCO 社) に交換し 3 日間培養した。その後、培養上清を回収し、上記 (2-3) の方法に従って、ZAQ 発現 CHO 細胞で FLIPR によるカルシウムアッセイで ZAQ 活性化能を測定した。これにより ヒト型 Bv8 を高発現する ZAQL-2 発現 CHO 細胞クローン No. 2 (以後、ZAQ L-2/CHO No. 4 と略称する) を選別した。

(3-3) ヒト型 Bv8 ペプチド発現 CHO 細胞無血清培養上清の調製

透析済み 10% ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社)、1 mM MEM 非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycin を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (日水製薬株式会社) で Single Tray (Nunc 社) 4 枚コンフルエントまで培養した ZAQL-2/CHO No. 4 をトリプシン処理して分散後、遠心して回収した。上記 Single Tray 1 枚分の細胞を上記培地 1.5 L に懸濁後、Cell Factories 10 (Nunc 社) に植え込み、4 基の Cell Factories 10 について 37°C で 5% 炭酸ガス中にて 3 日間培養した。培養上清を除いた後、前述の H/HBSS 1 L で 1 基の Cell Factories 10 の細胞を洗浄した。H/HBSS を除いた後、1 基の Cell Factories 10 あたり 2 L の無血清培地 (1 mM MEM 非必須アミノ酸溶液、100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycin を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium 培地) を加えさらに 2 日間培養した。回収した培養上清を日立高速遠心機で 1,000 rpm で 10 分間遠心後、ガーゼを用いてろ過し、清澄な上清を得た。これに酢酸を最終濃度 1 M になるように添加し、以下の操作を行った。

(3-4) ヒト型 Bv8 ペプチド発現 CHO 細胞無血清培養上清のオクタドデシル逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタドデシル基を固定したシリカゲルを充填した PrepC18 (Waters 社) をメタノールで膨潤後、ガラス製カラムに充填した (BioRad 社製; 内径 5cm, 高さ 10cm)。その後、1 M 酢酸で平衡化したカラムに、上記 (3-3) で調製した抽出液を添着した。次にこのカラムを 800 ml の 1 M 酢酸で洗浄した。次に、このカラムに 1000 ml の 60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機 (12EL; VirTis 社) にて凍結乾燥した。

(3-5) Wakosil-II 5C18HG Prep 逆相高速液体クロマト

グラフィーによる分離

Wakosil-II 5C18HG Prep逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム（和光純薬、20mm×250mm）を、40℃にて、流速 5 ml/minでA液（0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水）容量91.7%/B液（0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル）容量8.

- 5 3%を流し平衡化した。上記（3-4）で得られた凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を1 M 酢酸36 mlを加えて溶解し遠心後、その内の1/3を該カラムに添着した後、流速 5 ml/minで、1分間かけてA液容量66.7%/B液容量33.3% まで上昇させ、次いで120分間かけてA液容量16.7%/B液容量83.3%まで、B液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。溶出液を5
- 10 mlずつフラクション番号をつけて分取した。この操作を3回実施し、上記（3-4）の凍結乾燥物を処理した。分取フラクションより各3 μ l を0.2% BSA 150 μ l と混合し、凍結乾燥機（12EL ; VirTis社）で凍結乾燥した。この乾燥物に、アッセイバッファー〔H/HBSS（ニッスイハックス2（日水製薬株式会社） 9.8 g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4
- 15 に合わせた後、フィルター滅菌処理）に、2.5 mM Probenecid および0.1% CHAPS を添加したもの〕150 μ lを加えて溶解し、この溶液50 μ l を用いて上記（2-3）の方法に準じ、ZAQレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQレセプター活性化作用を有する成分は、主としてフラクションNo. 73-74 に溶出されていることが判明した。

- 20 （3-6）TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィーによる分離

- TSKgel CM-2SWイオン交換高速液体クロマトグラフィー用カラム（東ソー、4.6 mm×250 mm）を25℃にて、流速 1 ml/minでA液（4 Mギ酸アンモニウム：蒸留水：アセトニトリル = 1 : 299 : 100）容量100%、B液（4 Mギ酸アンモニウム
- 25 : 蒸留水：アセトニトリル = 1 : 2 : 1）容量0%を流し平衡化した。上記（3-5）で得られたフラクションNo. 73-74を凍結乾燥したものをA液4 mlに溶解し、TSKgel CM-2SWイオン交換カラムに添着した後、流速 2 ml/minで120分間かけてA液容量25%/B液容量75%まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を2 mlずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各

2 μ l を0.2% BSA 100 μ l と混合し凍結乾燥機 (12EL ; VirTis社) で凍結乾燥した。この乾燥物に上記アッセイバッファー 100 μ l を加えて溶解しこれをさらに同バッファーで100倍希釈し、上記 (2-3) の方法に準じ、ZAQレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQレセプター活性化作用を有する成分はフラクションNo. 83-85に溶出されていることが判明した。

(3-7) TSKgel ODS-80Ts 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel ODS-80Ts 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー、4.6 mm x 100 mm) を、40℃にて、流速 1 ml/minでA液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) 容量91.7%/B液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量8.3%を流し平衡化した。上記 (3-6) で得られたフラクションNo. 83-85の凍結乾燥物についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、凍結乾燥物を 1 M酢酸 2 ml を加えて溶解し該カラムに添着した後、流速 1 ml/minで、1分間かけてA液容量75%/B液容量25% まで上昇させ、次いで60分間かけてA液容量25%/B液容量75% までB液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を0.5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。フラクションNo. 121-130について各 1 μ l を採取し、上記アッセイバッファーで100倍希釈し、上記 (2-3) の方法に準じ、ZAQレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQレセプター活性化作用を有する成分はフラクションNo. 123-125に溶出されていることが判明した。

(3-8) TSKgel Super-Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

TSKgel Super-Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー、4.6 mm x 100 mm) を、40℃にて、流速 1 ml/minでA液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) 容量91.7%/B液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量8.3%を流し平衡化した。上記 (3-7) で得られたフラクションNo. 123-125についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクション溶液を直接ロードし、該カラムに添着した後、流速 1 ml/minで、1分間かけてA液容量75%/B液容量25% まで上昇させ、次いで60分間かけてA液容量25%/B液容量75%までB液濃度

を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液を0.5 mlずつフラクション番号をつけて分取した。フラクションNo. 91-100について各1 μ lを採取し、上記アッセイバッファーで100倍希釈し、上記(2-3)の方法に準じ、ZAQレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQレセプター活性化作用を有する成分はフラクションNo. 97-98に溶出されていることが判明した。

(3-9) TSKgel Super-Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィーによる再精製

TSKgel Super-Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー、4.6 mm x 100 mm) を、40℃にて、流速 1 ml/minでA液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) 容量91.7%/B液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量8.3%を流し平衡化した。上記(3-8)で得られたフラクションNo. 97-98についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクション溶液を直接ロードし該カラムに添着した後、流速 1 ml/minで、1分間かけてA液容量75%/B液容量25%まで上昇させ、次いで60分間かけてA液容量25%/B液容量75%までB液濃度を直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。その結果、目的とするZAQレセプター活性化作用を有する成分は単一なピークとして溶出された。

(3-10) 精製されたヒト型Bv8ペプチドの構造解析

上記(3-9)で得られたZAQ活性化主成分について、以下の方法で構造決定を実施した。精製したヒト型Bv8ペプチドを凍結乾燥機 (12EL; VirTis社) にて凍結乾燥した。得られたペプチド凍結乾燥物を、DMSO (ジメチルスルフォキシド) に溶解した。この溶液の一部をプロテインシーケンサー (パーキンエルマー社、PE Biosystems Procise 491cLC) を用いたN末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、予想されるヒト型Bv8成熟体ペプチド、配列番号: 19で表されるアミノ酸配列と一致するN端アミノ酸配列を得た。また、Finnigan LCQ LC/MS装置を用いて、エレクトロスプレーイオン化法により質量分析を行い、分子量が8664.34であると算定した。本測定値はヒト型Bv8成熟体ペプチド (配列番号: 19) の理論値8792.54に比べて128.2小さな値となっており、成熟体ペプチドからさらにC末端のLys残基が脱落したペプチド (配列番号: 22) が取得できたことが確認された。

実施例4 ヒト型Bv8ペプチドの反応性の測定

実施例3で得られた精製ヒト型Bv8ペプチドの、Z A Q及びI 5 Eレセプター活性化作用を、上記(2-3)に記載した方法に準じ、測定した。

- 5 その結果、Z A Qレセプター発現CHO細胞及びI 5 Eレセプター発現CHO細胞において、ヒト型Bv8ペプチドは濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。また、ヘビ毒M I T 1は、ヒト型Bv8ペプチドに比べて10倍程度低い濃度よりI 5 Eレセプター活性化作用を現した。結果を〔図9〕および〔図10〕に示す。

10

実施例5 ラット型Bv8ペプチド cDNAのクローニング

ラット精巣Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型として、degenerateプライマー BF2(配列番号:23)とプライマー BR1(配列番号:24)を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

- 15 BF2: 5'-GCTTGYGACAAGGACTCYCA-3' (配列番号:23)

BR1: 5'-GTTYCTACTYCAGAGYGAT-3' (配列番号:24)

- PCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を0.4 μ l、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μ g/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を2 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を1.6 μ l、10 μ MプライマーBF2及びBR1を0.4 μ l、
20 鋳型cDNAを2 μ l、及び蒸留水を13.2 μ lを混合して作製した。反応条件は95 $^{\circ}$ C・1分の初期変性後、95 $^{\circ}$ C・30秒-55 $^{\circ}$ C・1分-68 $^{\circ}$ C・1分のサイクル反応を40回、および68 $^{\circ}$ C・5分の最終伸長反応とした。

- 得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニ
25 ュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号:25で表される部分配列を得た。

この配列情報よりプライマー RB5-1(配列番号:26)とプライマー RB5-3(配列番号:27)を作成し、以下に記した5' RACE実験を実施した。

RB5-1: 5'-GTGCATCCTCCGCCCCAAAATGGAA-3' (配列番号: 26)

RB5-3: 5'-GACAGCGCAGCACATTCTCTCCACAC-3' (配列番号: 27)

5' RACEのPCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μ g/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μ l、10 μ MプライマーRB5-1を1 μ l、10 μ MプライマーAP1 (プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型cDNA (CLONTECH社、ラット精巣Marathon-Ready cDNA)を5 μ l、及び蒸留水を33 μ lを混合して作製した。反応条件は94 $^{\circ}$ C・1分の初期変性後、94 $^{\circ}$ C・30秒-72 $^{\circ}$ C・3分のサイクル反応を5回、94 $^{\circ}$ C・30秒-70 $^{\circ}$ C・3分のサイクル反応を5回、94 $^{\circ}$ C・30秒-68 $^{\circ}$ C・3分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μ g/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μ l、10 μ MプライマーRB5-3を1 μ l、10 μ MプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型cDNA (該PCR反応液50倍希釈液)を5 μ l、及び蒸留水を33 μ lを混合して作製した。反応条件は94 $^{\circ}$ C・1分の初期変性後、94 $^{\circ}$ C・30秒-68 $^{\circ}$ C・3分のサイクル反応を35回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、5'端の配列 (配列番号: 28) を得た。

25 配列番号: 25の情報より、プライマー RB3-1 (配列番号: 29) とプライマーRB3-2 (配列番号: 30) を作成し、以下に記した3' RACE実験を実施した。

RB3-1: 5'-GAGACAGCTGCCACCCCTGACTCGGAA-3' (配列番号: 29)

RB3-2: 5'-GGCGGAGGATGACCCACACTTGTCCTG-3' (配列番号: 30)

3' RACEのPCR反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l

、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μg/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40) を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造) を4 μl、10 μMプライマーRB3-1を1 μl、10 μMプライマーAP1 (プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型cDNA (CLONTECH社、ラット精巣Marathon-Ready cDNA) を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-72℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-70℃・3分のサイクル反応を5回、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50X Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社) を1 μl、添付の10x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μg/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40) を5 μl、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造) を4 μl、10 μMプライマーRB3-2を1 μl、10 μMプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μl、鋳型cDNA (該PCR反応液50倍希釈液) を5 μl、及び蒸留水を33 μlを混合して作製した。反応条件は94℃・1分の初期変性後、94℃・30秒-68℃・3分のサイクル反応を35回行った。

得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社) を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、3' 端の配列 (配列番号: 3 1) を得た。

ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社) を鋳型として、上記5' RACE及び3' RACEの情報より、プライマーRBv8-WF1 (配列番号: 3 2)、プライマー RBv8-WF2 (配列番号: 3 3)、プライマー RBv8-WR1 (配列番号: 3 4) およびプライマー RBv8-WR2 (配列番号: 3 5) を作成し、以下に記したPCR反応を実施した。

RBv8-WF1: 5'-TAACCGCCACCGCCTCT-3' (配列番号: 3 2)

RBv8-WF2: 5'-GGGACGCCATGGAGGAC-3' (配列番号: 3 3)

RBv8-WR1: 5'-CGAGACTTGACAGACATTGTTCAGTG-3' (配列番号: 3 4)

RBv8-WR2: 5'-TTTCCAGCTCCTGCTTCAGA-3' (配列番号: 3 5)

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を0.6 μ l、添付の10x PCR bufferを3 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μ l、10 μ MプライマーRBv8-WF1及びRBv8-WR1を各1.5 μ l、鋳型DNAを3 μ l、及び蒸留水を18 μ lを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を蒸留水で50倍に希釈したものを鋳型としてnested PCRを行った。PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社)を0.6 μ l、添付の10x PCR bufferを3 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを2.4 μ l、10 μ MプライマーRBv8-WF2及びRBv8-WR2を各1.5 μ l、鋳型DNAを3 μ l、及び蒸留水を18 μ lを混合して作製した。反応条件は95℃・1分の初期変性後、95℃・30秒-55℃・30秒-72℃・1分のサイクル反応を35回、および72℃・5分の最終伸長反応とした。

得られたDNA断片をZero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読し、配列番号：36で表される356bpの塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号：36で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpRBvと命名した。プラスミドpRBvにより大腸菌 (Escherichia coli) をトランスフォームさせ、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/ pRBvと命名した。

このDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号：36で表わされるDNA断片は、配列番号：37で表わされるラット型Bv8前駆体ペプチド(107アミノ酸残基)をコードするDNA(配列番号：38)を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号：38で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号：38で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号：39で表わされるラット型Bv8成熟体ペプチド(81アミノ酸残基)をコードする243塩基対からなるDNA(配列番号：40)を含んでいることが明らかとなった。

実施例6 ラット脳cDNA由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質(rZAQ1)をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラット全脳cDNAライブラリー (CLONTECH社)を鋳型とし、2種類のプライマー

- 1 及び 2 (配列番号: 4 1 および配列番号: 4 2) を用いて P C R 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA を 10 分の 1 量鋳型として使用し、Advantage-2 cDNA polymerase Mix (CLONTECH 社) 1/50 量、プライマー各 0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 μ l の液量とした。PCR
- 5 反応は、(i) 94 $^{\circ}$ C・2 分の後、(ii) 94 $^{\circ}$ C・20 秒、72 $^{\circ}$ C・1 分 30 秒のサイクルを 3 回、(iii) 94 $^{\circ}$ C・20 秒、68 $^{\circ}$ C・1 分 30 秒のサイクルを 3 回、(iv) 94 $^{\circ}$ C・20 秒、62 $^{\circ}$ C・20 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 36 回繰り返し、最後に 68 $^{\circ}$ C・7 分の伸長反応を行った。該 P C R 反応後の反応産物を TOPO-TA クローニングキット (Invitrogen 社) の処方に従いプラスミドベクター pCR2.1-TOPO (Invitrogen 社) へサブクロー
- 10 ニングした。これを大腸菌 DH5 α に導入し、cDNA を持つクローンを、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする cDNA (配列番号: 4 3) を得た。該 cDNA の塩基配列から導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 4 4) には、配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列と 83.7% の相同性がみられた。このア
- 15 ミノ酸配列を含有する新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質を rZAQ1 と命名した。また配列番号: 4 3 で表わされる塩基配列を有する DNA を含有する形質転換体 (大腸菌) については、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH5 α / pCR2.1-rZAQ1 と命名した。
- 20 実施例 7 ラット脳 cDNA 由来 新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質 (rZAQ2) をコードする cDNA のクローニングと塩基配列の決定
- rZAQ2 をコードするクローンは、genetrapper 法で取得した。すなわち、プローブ 1 及び 2 (配列番号: 4 5 および配列番号: 4 6) をピオチン化したのち、一本鎖にしたラット全脳 cDNA ライブラリー (GIBCO-BRL 社) とハイブリダイゼーションし、得られた一本鎖遺伝子をプライマー 1 及び 2 (配列番号: 4 7 および配
- 25 列番号: 4 8) を用いて二本鎖に修復した。この遺伝子を大腸菌 DH10B にエレクトロポレーションし、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を得た。さらに、プローブ 1 (配列番号: 4 5) とプライマー 3 (配列番号: 4 9) を用いたコロニー PCR で、目的とする塩基配列をコードするクローンを選択した。このク

ローンの塩基配列から予測されるORF (open reading frame) の塩基配列 (配列番号: 50) より導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 51) は、rZAQ1と80.6%の相同性がみられた。このアミノ酸配列を有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をrZAQ2と命名した。また、このgenetrapper法で取得した形質転換体 (大腸菌) を、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH10B /pCMV-rZAQ2と命名した。

実施例8 モルモット回腸摘出標本を用いた収縮実験

モルモット (std:Hartley、7-8週令、雄性、体重450 g程度) の頸動脈をはさみで切断し失血死させた後、開腹し回腸を摘出した。回腸を、95% O₂-5% CO₂ ガスを吹き込んだTyrode液 (組成: 138 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.8 mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂、1.1 mM NaH₂PO₄、11.9 mM NaHCO₃、5.6 mM glucose) を入れたガラスシャーレに入れ、手術用はさみとピンセットを用いて回腸に付着している脂肪片や結合組織を除去した後に、約1.5 cmの長さに切り標本として用いた。この標本を37℃に暖めた上記Tyrode液を満たしたオーガンバス (20 ml) 中に懸垂し、0.5 gの負荷をかけて30分以上かけて安定させた。回腸標本の収縮反応は、NEC三栄のAMPLIFIER CASE 7747を用いて測定した。アセチルコリン1 μMを投与し最大収縮反応を測定した後に、参考例1の方法に準じて得られた精製ヒト型Bv8ペプチドまたはヘビ毒MIT1を累積投与して収縮反応を測定した。

ヒト型Bv8とMIT1の希釈には0.05% bovine serum albuminを含む生理食塩水を用いた。

結果を〔図11〕に示す。

ヒト型Bv8およびMIT1により惹起される収縮反応は、アセチルコリン1 μMにより惹起される収縮反応を100%としてパーセントで示した。その結果、ヒト型Bv8とMIT1は容量依存的に強力な収縮反応を惹起した。容量反応曲線から算出したヒト型Bv8およびMIT1のEC₅₀値は、それぞれ0.57 nMおよび0.40 nMであった。

参考例1 大腸菌でのヒト型Bv8ペプチド (配列番号: 19) の製造

(1) 大腸菌でのヒト型B v 8 ペプチド発現プラスミドの構築

(a) ヒト型B v 8 の構造遺伝子の調製

6種のDNA断片#1～#6（配列番号：65～配列番号：70）を用いて、ヒト型B v 8の構造遺伝子を調製した。

5 (b) DNAオリゴマーのリン酸化

5'側になるべき上記#1および#6を除いた4種のDNAオリゴマー（#2～#5）各々を、25 μ lのリン酸化反応液〔DNAオリゴマー10 μ g, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM スペルミジン, 10 mM ジチオスレイトール（以後DTTと略記）, 0.1 mg/ml ウシ血清アルブミン（以後BSAと略記）, 1 mM ATP, 10 ユニットT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）〕中で37℃・1時間反応させ、各オリゴマーの5'末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

(c) DNAフラグメントの連結

15 上記(b)で得られたDNAフラグメントと上記#1および#6を合わせ、120 μ lとした。この混合液を90℃で10分間保持した後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver. 2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液30 μ lにキットに付属のII液30 μ lを加え、よく混合した後、キットに付属のI液60 μ lを加え、37℃・1
20 時間反応させ、ライゲーションを行った。その後、フェノール処理を行ない、水層を回収して2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。この様にして得られたDNAフラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、以下の工程(d)に供した。

(d) ヒト型B v 8 発現ベクターの構築

25 発現用ベクターとしてはpTCII（特開2000-178297号公報に記載）をNde IおよびBamHI（宝酒造）で37℃・2時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.3 kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、25 μ lのTE緩衝液に溶解した。このpTCIIのNde I、BamHI断片と上記により調製したヒト型B v 8の構造遺伝子（配

列番号：71) をTaKaRa DNA ligation kit ver. 2 (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を $10\mu\text{l}$ 用いて大腸菌JM109コンピテントセル(東洋紡)を形質転換し、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、 37°C で1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー
5 選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドpTCh2ZAAQを調製した。このヒト型Bv8 DNAの塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377 DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTCh2ZAAQを大腸菌(*Escherichia coli*) MM294 (DE3) に形質転換し、ヒト型Bv8発現株*Escherichia coli*
10 MM294 (DE3) / pTCh2ZAAQを得た。

(2) ヒト型Bv8ペプチドの製造

上記の*Escherichia coli* MM294 (DE3) / pTCh2ZAAQを $5.0\text{mg}/\text{L}$ のテトラサイクリンを含むLB培地・ 1L (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%
15 塩化ナトリウム) を用いて2L容フラスコ中で 37°C 、8時間振とう培養した。得られた培養液を19Lの主発酵培地 (1.68%リン酸1水素ナトリウム、0.3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第1鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%ハイケー
20 スアミノ) を仕込んだ50L容発酵槽へ移植して、 30°C で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が500クレット単位になったところで、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が $12\text{mg}/\text{L}$ になるように添加し、さらに4時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約500gの湿菌体
を取得し、 -80°C で保存した。

25 (3) ヒト型Bv8ペプチドの活性化

上記(2)で得られた菌体400gに、 200mM トリス/HCl、 7M グアニジン塩酸塩 (pH8.0) 800ml を加えて菌体を溶解した後、遠心分離 (10000rpm 、1時間) を行った。上澄液に 0.4M アルギニン、 50mM トリス/HCl、 0.2mM GSSG (酸化型グルタチオン)、 1mM GS

H (還元型グルタチオン) (pH 8.0) 20リットルを加えて、4℃で一晩活性化を行った。

(4) ヒト型Bv8ペプチドの精製

上記(3)で活性化の終了した再生液をpH 6.0に調整し、50mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したSP-セファロースカラム (11.3cm × 15cm) に吸着させた後、600mM NaCl / 50mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で溶出し、ヒト型Bv8を含むフラクションをプールした。この画分を50mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したSP-5PW (21.5mm × 150mmL) に通液し、吸着、洗浄した後、0-100%B (B = 50mMリン酸緩衝液 + 1M NaCl, pH 6.05) の段階勾配 (60分) で溶出を行いヒト型Bv8画分 (溶出時間約40分) を得た。この画分を、さらに0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50 (21.5mm ID × 300mmL, 昭和電工) に通液し、吸着、洗浄した後、25-50%B (B : 80%アセトニトリル / 0.1%トリフルオロ酢酸) の段階勾配 (60分) で溶出を行い、ヒト型Bv8画分 (溶出時間約30分) をプールした後、凍結乾燥を行い、ヒト型Bv8凍結乾燥粉末約25mgを得た。

(5) ヒト型Bv8ペプチドの特徴決定

(a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

上記(4)で得られたヒト型Bv8を100mM DTTを添加したSample buffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] に懸濁し、95℃で1分間加熱した後、マルチゲル15/25 (第一化学薬品) で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー (Coomassie brilliant blue) で染色した結果、9kDaの位置に単一の蛋白バンドが認められた。このことから、上記(4)で得られた大腸菌由来の組換え型ヒト型Bv8の標品は極めて高純度であることが分かった。

(b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計 (日立L-8500A Amino Acid Analyzer) を用いて決定した。その結果、ヒト型Bv8 (配列番号: 19で表されるアミノ酸配列からなるペプチド) のDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸組成と

一致した（表2）。

表2

5	アミノ酸	1モル当たりの	ヒト型B v 8の塩基配列
		残 基 数	から予測される値
	A s x	4. 0	4
	T h r ¹⁾	4. 6	5
	S e r ¹⁾	4. 3	5
10	G l x	2. 3	2
	P r o	5. 2	5
	G l y	7. 8	8
	A l a	5. 0	5
	C y s ²⁾	N. D.	1 0
15	V a l	3. 8	4
	M e t	2. 8	3
	I l e	4. 2	5
	L e u	6	6
	T y r	0	0
20	P h e	3. 7	4
	H i s	2. 9	3
	L y s	4. 9	5
	A r g	5. 8	6
	T r p	0. 9.	1

25

酸加水分解（6N HCl－4%チオグリコール酸、110℃、24及び48時間加水分解の平均値）

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

(c) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（PEアプライドバイオシステムズ モデル492）を用いて決定した。その結果、得られたヒト型Bv8
5 のDNAの塩基配列から推定されたヒト型Bv8のN末端アミノ酸配列と一致した（表3）。

表3

残基 No.	検出された PTH-アミノ酸 ¹⁾ (pmol)	ヒト型Bv8の塩基配列 から予測される アミノ酸
10	1	Ala (103)
	2	Val (99)
15	3	Ile (88)
	4	Thr (54)
	5	Gly (66)
	6	Ala (79)
	7	N. D.
20	8	Asp (47)
	9	Lys (62)
	10	Asp (50)
	11	Ser (36)
	12	Gln (52)
25	13	N. D.
	14	Gly (44)
	15	Gly (55)
	16	Gly (56)
	17	Met (50)

136

18	N. D.	C y s
19	N. D.	C y s
20	A l a (33)	A l a

- 5 1) PTH (フェニールチオヒダントイン) 誘導体として検出した。ヒト型Bv8を150 pmol用いて分析を行った。

N. D. は未検出を示す。

(d) C末端アミノ酸分析

- 10 C末端アミノ酸をアミノ酸分析計 (日立L-8500A Amino Acid Analyzer) を用いて決定した。得られたヒト型Bv8はDNAの塩基配列から推定されたC末端アミノ酸と一致した (表4)。

表4

C末端アミノ酸	回収率 (%)
L y s	18.9

- 15 気相ヒドラジン分解法 (100℃, 3.5時間)

(6) ヒト型Bv8ペプチドの活性測定 (FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定)

- 20 上記(4)で得られた純化された大腸菌由来の組換え型ヒト型Bv8標品を実施例2(2-3)の方法を用いて、活性測定 (FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定) を行った。その結果、CHO細胞由来の組換え型標品 (ヒト型Bv8の精製品: 実施例3) と同等の活性を有していた。

産業上の利用可能性

- 25 本発明のペプチド、本発明のペプチドをコードするDNA (以下、本発明のDNAと略記する場合がある) および本発明のペプチドに対する抗体 (以下、本発明の抗体と略記する場合がある) は、(i) 本発明のペプチドが関与する各種疾

- 病の治療・予防剤、(ii) 本発明のペプチドと本発明のタンパク質との結合性を
変化させる化合物またはその塩のスクリーニング、(iii) 本発明のペプチドま
たはその塩の定量、(iv) 遺伝子診断剤、(v) アンチセンスDNAを含有する
医薬、(vi) 本発明の抗体を含有する医薬および診断薬、(vii) 本発明のDN
5 Aを有する非ヒト動物の作出、(viii) 構造的に類似したリガンド・レセプター
との比較にもとづいたドラッグデザイン、などの実施のために有用である。特に
、本発明のペプチドと本発明のタンパク質とを用いたスクリーニングによって得
られる化合物またはその塩は、消化器疾患、中枢神経疾患などの医薬として安全
に用いられうる。

請求の範囲

1. 配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプチドまたはその塩および配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
2. 配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドもしくはその部分ペプチドまたはその塩および配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
3. 請求項1記載のスクリーニング方法または請求項2記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、配列番号：19もしくは配列番号：39で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩と配列番号：1、配列番号：44、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53もしくは配列番号：54で表わされるアミノ酸配列と同一または

実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

4. 請求項3記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

5. 消化器疾患の予防・治療剤である請求項4記載の医薬。

5 6. 配列番号：37で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするペプチドまたはその塩。

7. 請求項6記載のペプチドをコードするDNA。

8. 配列番号：38で表される塩基配列を含有する請求項7記載のDNA。

9. 配列番号：40で表される塩基配列を含有するDNA。

10 10. 請求項8記載のDNAを含有する組換えベクター。

11. 請求項10記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、請求項6記載のペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項6記載のペプチドまたはその塩の製造法。

15 13. 配列番号：39で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩に対する抗体。

14. 請求項13記載の抗体を含有してなる診断薬。

15. 消化器疾患の診断薬である請求項14記載の診断薬。

16. 外来性の、請求項7記載のDNAまたはその変異DNAを含有する非ヒト哺乳動物。

20 17. 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である請求項16記載の動物。

18. ゲッ歯動物がラットである請求項17記載の動物。

19. 外来性の、請求項9記載のDNAまたはその変異DNAを含有し、非ヒト哺乳動物において発現しうる組換えベクター。

25 20. 請求項7または請求項9記載のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞。

21. DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化された請求項20記載の胚幹細胞。

22. 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である請求項21記載の胚幹細胞。

23. 請求項7または請求項9記載のDNAが不活性化された該DNA発現不全

非ヒト哺乳動物。

24. DNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる請求項23記載の非ヒト哺乳動物。

- 5 25. 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である請求項23記載の非ヒト哺乳動物。

26. 請求項24記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする請求項7または請求項9記載のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

27. 哺乳動物に対し、請求項3記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする消化器疾患の予防・治療方法。
- 10

28. 消化器疾患予防・治療剤を製造するための、請求項3記載の化合物またはその塩の使用。

1/11

☒ 1

10 20 30 40 50 60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT
M E T T M G F M D D N A T N T S T S F L

70 80 90 100 110 120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC
S V L N P H G A H A T S F P F N F S Y S

130 140 150 160 170 180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCAGGACGTTCTTTGCT
D Y D M P L D E D E D V T N S R T F F A

190 200 210 220 230 240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAC
A K I V I G M A L V G I M L V C G I G N

250 260 270 280 290 300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC
F I F I A A L V R Y K K L R N L T N L L

310 320 330 340 350 360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCCTTTGAGATG
I A N L A I S D F L V A I V C C P F E M

370 380 390 400 410 420
GACTACTATGTGGTGGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC
D Y Y V V R Q L S W E H G H V L C T S V

2/11

☒ 2

430 440 450 460 470 480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N Y L R T V S L Y V S T N A L L A I A I

490 500 510 520 530 540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D R Y L A I V H P L R P R M K C Q T A T

550 560 570 580 590 600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G L I A L V W T V S I L I A I P S A Y F

610 620 630 640 650 660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T T E T V L V I V K S Q E K I F C G Q I

670 680 690 700 710 720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W P V D Q Q L Y Y K S Y F L F I F G I E

730 740 750 760 770 780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F V G P V V T M T L C Y A R I S R E L W

790 800 810 820 830 840
TTCAAGGCGGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F K A V P G F Q T E Q I R K R L R C R R

850 860 870 880 890 900
AAGACGGTCCTGGTGTCTCATGTGCATCCTACCGCCTACGTGCTATGCTGGGCGCCCTTC
K T V L V L M C I L T A Y V L C W A P F

3/11

☒ 3

910 920 930 940 950 960
TACGGCTTCACCATCGTGCGGACTTCTTCCCCACCGTGTTGCGTGAAGGAGAAGCACTAC
Y G F T I V R D F F P T V F V K E K H Y

970 980 990 1000 1010 1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATCGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
L T A F Y I V E C I A M S N S M I N T L

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
C F V T V K N D T V K Y F K K I M L L H

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
W K A S Y N G G K S S A D L D L K T I G

1150 1160 1170 1180 1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
M P A T E E V D C I R L K *

4/11

☒ 4

10	20	30	40	50	60
ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATGACAATGCCACCAACACTTCCACCAGCTTCCTT					
M E T T M G F M D D N A T N T S T S F L					
70	80	90	100	110	120
TCTGTGCTCAACCCTCATGGAGCCCATGCCACTTCCTTCCCATTCAACTTCAGCTACAGC					
S V L N P H G A H A T S F P F N F S Y S					
130	140	150	160	170	180
GACTATGATATGCCTTTGGATGAAGATGAGGATGTGACCAATTCCAGGACGTTCTTTGCT					
D Y D M P L D E D E D V T N S R T F F A					
190	200	210	220	230	240
GCCAAGATTGTCATTGGGATGGCCCTGGTGGGCATCATGCTGGTCTGCGGCATTGGAAAC					
A K I V I G M A L V G I M L V C G I G N					
250	260	270	280	290	300
TTCATCTTTATCGCTGCCCTGGTCCGCTACAAGAACTGCGCAACCTCACCAACCTGCTC					
F I F I A A L V R Y K K L R N L T N L L					
310	320	330	340	350	360
ATCGCCAACCTGGCCATCTCTGACTTCCTGGTGGCCATTGTCTGCTGCCCTTTGAGATG					
I A N L A I S D F L V A I V C C P F E M					
370	380	390	400	410	420
GACTACTATGTGGTGGCCAGCTCTCCTGGGAGCACGGCCACGTCCTGTGCACCTCTGTC					
D Y Y V V R Q L S W E H G H V L C T S V					

5/11

☒ 5

430 440 450 460 470 480
AACTACCTGCGCACTGTCTCTCTCTATGTCTCCACCAATGCCCTGCTGGCCATCGCCATT
N Y L R T V S L Y V S T N A L L A I A I

490 500 510 520 530 540
GACAGGTATCTGGCTATTGTCCATCCGCTGAGACCACGGATGAAGTGCCAAACAGCCACT
D R Y L A I V H P L R P R M K C Q T A T

550 560 570 580 590 600
GGCCTGATTGCCTTGGTGTGGACGGTGTCCATCCTGATCGCCATCCCTTCCGCCTACTTC
G L I A L V W T V S I L I A I P S A Y F

610 620 630 640 650 660
ACCACCGAGACGGTCCTCGTCATTGTCAAGAGCCAGGAAAAGATCTTCTGCGGCCAGATC
T T E T V L V I V K S Q E K I F C G Q I

670 680 690 700 710 720
TGGCCTGTGGACCAGCAGCTCTACTACAAGTCCTACTTCCTCTTTATCTTTGGCATAGAA
W P V D Q Q L Y Y K S Y F L F I F G I E

730 740 750 760 770 780
TTCGTGGGCCCCGTGGTCACCATGACCCTGTGCTATGCCAGGATCTCCCGGGAGCTCTGG
F V G P V V T M T L C Y A R I S R E L W

790 800 810 820 830 840
TTCAAGCGCGTCCCTGGATTCCAGACAGAGCAGATCCGCAAGAGGCTGCGCTGCCGCAGG
F K A V P G F Q T E Q I R K R L R C R R

850 860 870 880 890 900
AAGACGGTCCTGGTGTCTCATGTGCATCCTCACCGCCTACGTGCTATGCTGGGCGCCCTTC
K T V L V L M C I L T A Y V L C W A P F

6/11

☒ 6

910 920 930 940 950 960
TACGGCTTCACCATCGTGCGGACTTCTTCCCCACCGTGTTTGTGAAGGAGAAGCACTAC
Y G F T I V R D F F P T V F V K E K H Y

970 980 990 1000 1010 1020
CTCACTGCCTTCTACATCGTCGAGTGCATGCCATGAGCAACAGCATGATCAACACTCTG
L T A F Y I V E C I A M S N S M I N T L

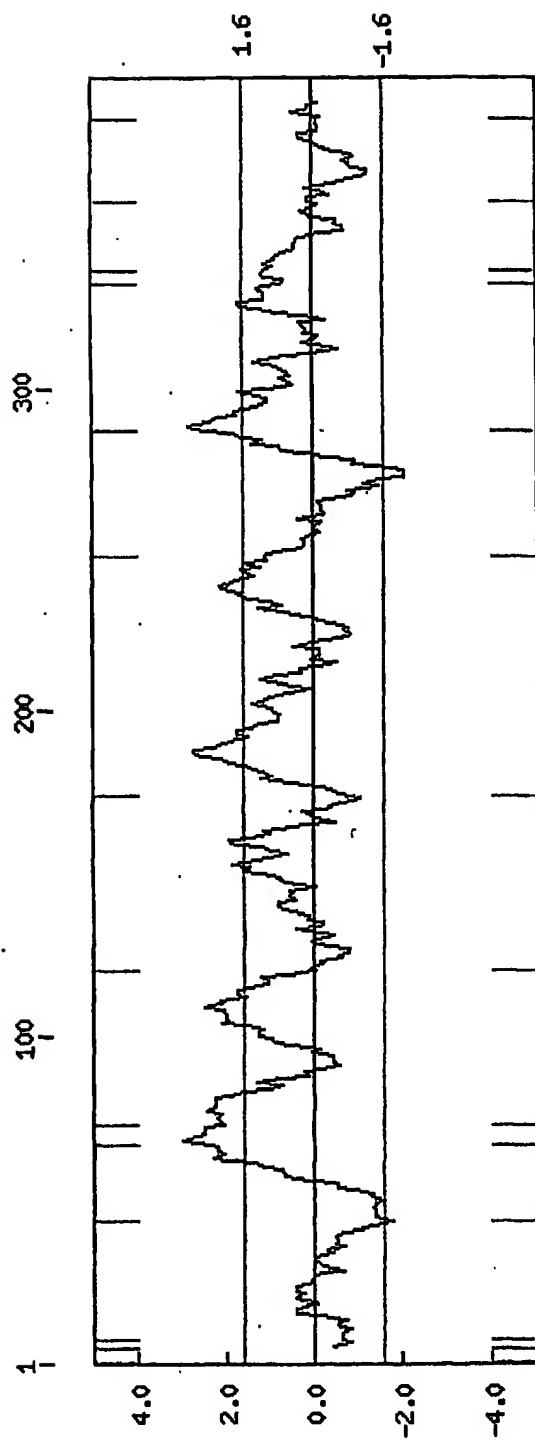
1030 1040 1050 1060 1070 1080
TGCTTCGTGACCGTCAAGAACGACACCGTCAAGTACTTCAAAAAGATCATGTTGCTCCAC
C F V T V K N D T V K Y F K K I M L L H

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TGGAAGGCTTCTTACAATGGCGGTAAGTCCAGTGCAGACCTGGACCTCAAGACAATTGGG
W K A S Y N G G K S S A D L D L K T I G

1150 1160 1170 1180 1190
ATGCCTGCCACCGAAGAGGTGGACTGCATCAGACTAAAATAA
M P A T E E V D C I R L K *

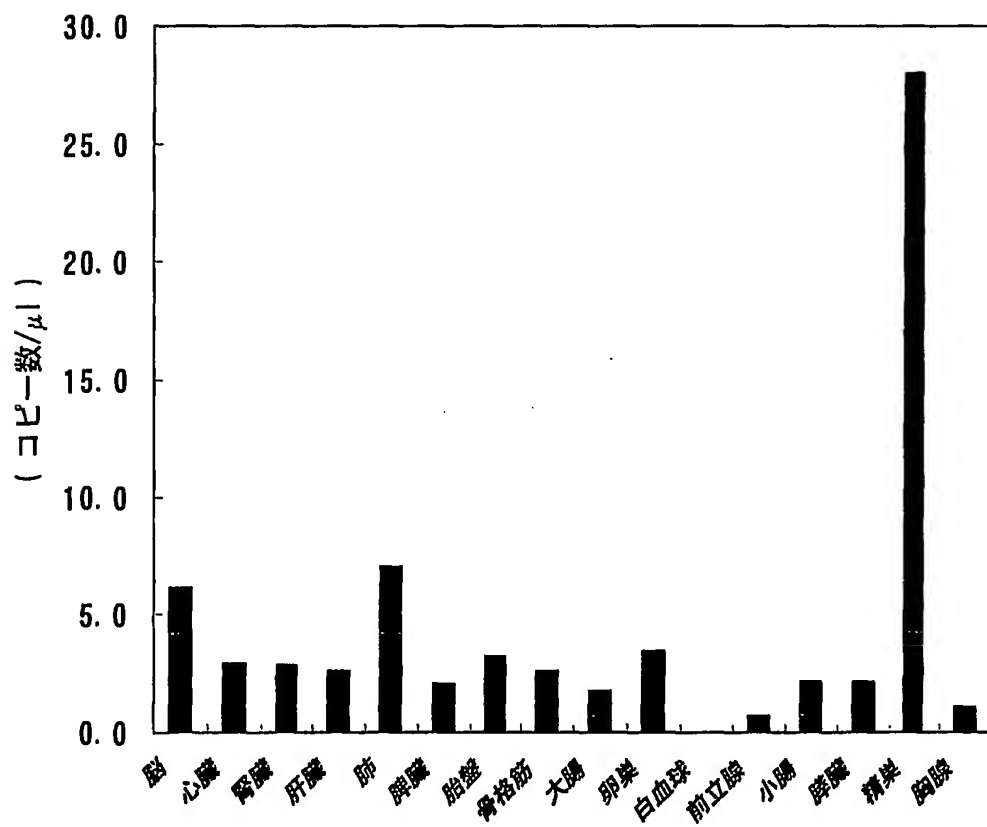
7/11

図 7



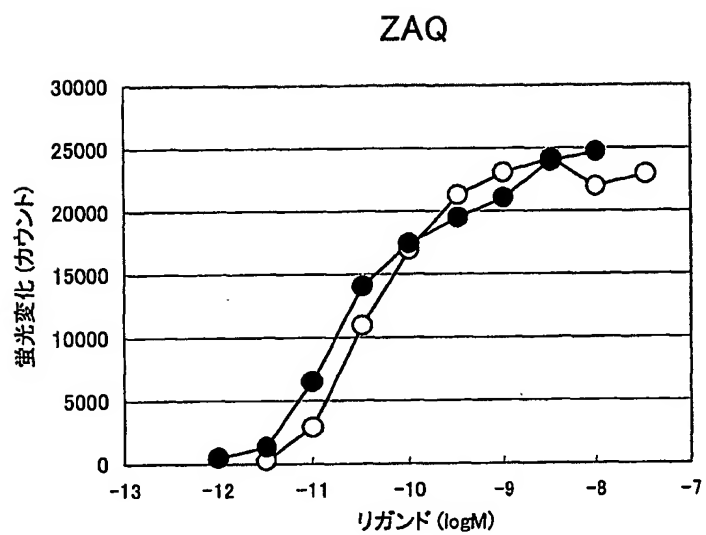
8/11

図 8



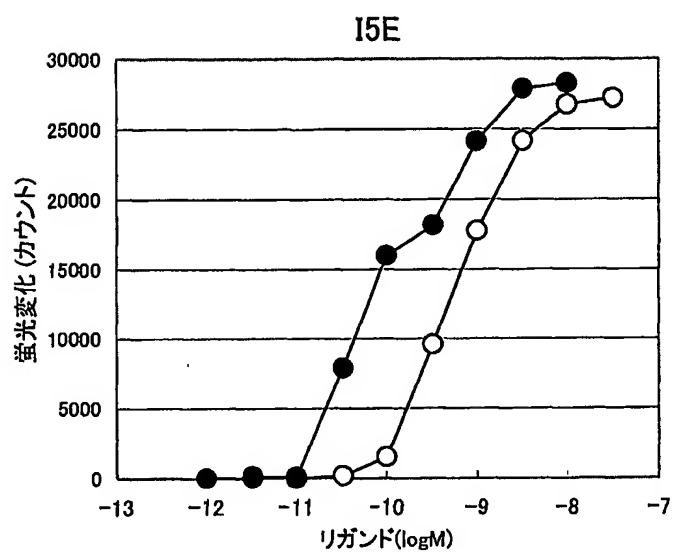
9/11

図 9



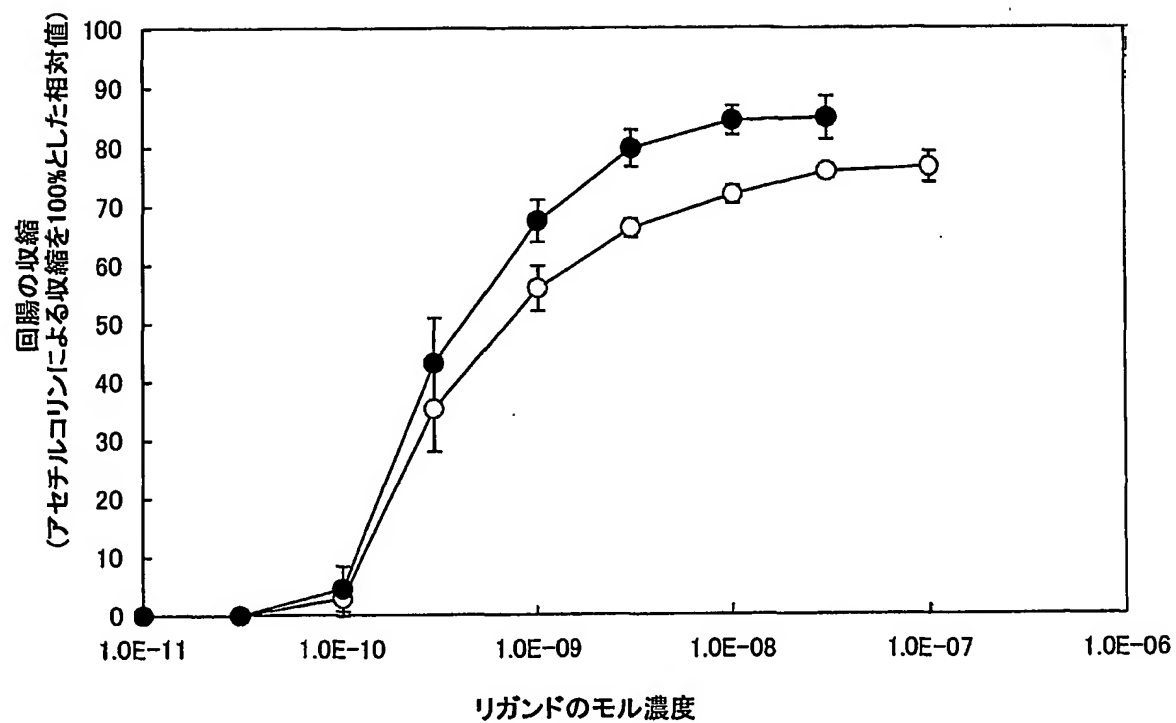
10/11

図 10



11/11

図 11



1/44

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Physiological Active Peptide and Its Use

<130> P01-0295PCT

<150> JP2001-026820

<151> 2001-02-02

<160> 71

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Human

$\langle 400 \rangle$ 1

Met	Glu	Thr	Thr	Met	Gly	Phe	Met	Asp	Asp	Asn	Ala	Thr	Asn	Thr	Ser
				5					10					15	
Thr	Ser	Phe	Leu	Ser	Val	Leu	Asn	Pro	His	Gly	Ala	His	Ala	Thr	Ser
			20					25					30		
Phe	Pro	Phe	Asn	Phe	Ser	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Asp	Met	Pro	Leu	Asp	Glu
		35					40					45			
Asp	Glu	Asp	Val	Thr	Asn	Ser	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Ala	Lys	Ile	Val
	50					55				60					
Ile	Gly	Met	Ala	Leu	Val	Gly	Ile	Met	Leu	Val	Cys	Gly	Ile	Gly	Asn
65					70					75					80

2/44

Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
 85 90 95
 Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
 100 105 110
 Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
 115 120 125
 Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
 130 135 140
 Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
 165 170 175
 Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
 195 200 205
 Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
 210 215 220
 Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
 225 230 235 240
 Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
 245 250 255
 Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
 260 265 270
 Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys
 275 280 285
 Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
 290 295 300
 Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr

3/44

305	310	315	320
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met			
	325	330	335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr			
	340	345	350
Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly			
	355	360	365
Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr			
	370	375	380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys			
385	390		

<210> 2

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```

atggagacca ccatgggggtt catggatgac aatgccacca acatttccac cagcttcctt   60
tctgtgtcca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc  120
gactatgata tgccctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct  180
gccaaagattg tcattgggat ggccctgggtg ggcatcatgc tggctgcgg cattggaaac  240
ttcatcttta tcgtgccct ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc  300
atgccaaacc tggccatctc tgacttctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg  360
gactactatg tggcgcgcca gctctcttg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc  420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg cctgtctggc catcgccatt  480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgtg agaccacgga tgaagtgcc aacagccact  540
ggcctgattg ccttgggtgtg gacggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc  600
accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc  660

```


4/44

tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
 ttcgtgggcc ccgtgggtcac catgaccctg tgctatgccg ggatctcccg ggagctctgg 780
 ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
 aagacggtcc tgggtgctcat gtgcacctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
 tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt tcgtgaagga gaagcactac 960
 ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
 tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgtccac 1080
 tggaaggctt cttacaatgg cgtlaagtc agtcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
 atgcctgccg ccgaagaggt ggactgcac agactaaaa 1179

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

atggagacca ccatgggggt catggatgac aatgccacca acacttccac cagcttcctt 60
 tctgtgtca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120
 gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180
 gccaaagtgc tcatgggat ggccctgggt ggcatcatgc tggctgagg cattggaaac 240
 ttcatcttta tcgtgcctt ggtccgtac aagaaactgc gcaacctcac caactgctc 300
 atgcccaacc tggccatctc tgacttctg gtggccattg tctgtgccc ctttgagatg 360
 gactactatg tggtgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
 aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480
 gacaggtatc tggctattgt ccatccgtg agaccagga tgaagtgcc aacagccact 540
 ggctgattg ccttgggtgt gacggtgtc atcctgatcg ccatccctc cgcctacttc 600
 accaccgaga cgttcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
 tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
 ttcgtgggcc ccgtgggtcac catgaccctg tgctatgccg ggatctcccg ggagctctgg 780

5/44

ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
aagacgggcc tgggtgctcat gtgcacctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcatc gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080
tggaaggcct cttacaatgg cggtaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcatc agactaaaa 1179

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 1

<400> 4

gtcgacatgg agaccacat ggggttcacg g 31

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 2

<400> 5

actagtttat tttagtctga tgcagtccac ctcttc 36

6/44

<210> 6

<211> 1152

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

```

atggcagccc agaatggaaa caccagtttc acaccaact ttaatccacc ccaagaccat   60
gcctcctccc tctcctttta cttcagttat ggtgattatg acctccctat ggatgaggat  120
gaggacatga ccaagacccg gaccttcttc gcagccaaga tcgtcattgg cattgcactg  180
gcaggcatca tgcitggtctg cggcatcggg aactttgtct ttatcgctgc cctcaccgcg  240
tataagaagt tgcgcaacct caccaatctg ctcatlgcca acctggccat ctccgacttc  300
ctgggtggcca tcatctgctg ccccttcgag atggactact acgtggtagc gcagctctcc  360
tgggagcatg gccacgtgct ctgtgcctcc gtcaactacc tgcgcaccgt ctccctctac  420
gtctccacca atgccttgct ggccattgcc attgacagat atctcgccat cggtcacccc  480
ttgaaaccac ggatgaatta tcaaacggcc tccttcctga tcgccttggg ctggatgggtg  540
tccatttctc ttgccatccc atcggtttac ttgcaacag aaaccgtcct ctttattgtc  600
aagagccagg agaagatctt ctgtggccag atctggcctg tggatcagca gctctactac  660
aagtcctact tcctcttcat ctttgggtgc gagttcgtgg gccctgtggg caccatgacc  720
ctgtgctatg ccaggatctc ccgggagctc tgggtcaagg cagtccctgg gttccagacg  780
gagcagattc gcaagcggct gcgtgccgc aggaagacgg tcctgggtgct catgtgcatt  840
ctcacggcct atgtgctgtg ctgggcaccc ttctacggtt tcaccatcgt tcgtgacttc  900
ttccccactg tgttcgtgaa ggaaaagcac tacctcactg ctttctacgt ggtcgagtgc  960
atcgccatga gcaacagcat gatcaacacc gtgtgcttcg tgacggtaa gaacaacacc 1020
atgaagtact tcaagaagat gatgtgctg cactggcgtc cctcccagcg ggggagcaag 1080
tccagtgtg accctgacct cagaaccaac ggggtgccca ccacagaaga agtggactgt 1140
atcaggctga ag                                     1152

```

<210> 7

7/44

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-F1 primer

<400> 7

ctacttctgc tgctgccgct gctggt 26

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-R1 primer

<400> 8

ttggaaagtt gaggaagcaa gagcattt 28

<210> 9

<211> 359

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

cacgccccgc gctggggacg ccgccgtgat caccggggct tggacaagg actcccaatg 60
tgggtggaggc atgtgctgtg ctgtcagtat ctgggtcaag agcataagga ttgcacacc 120

8/44

tatgggcaaa ctgggagaca gctgcatcc actgactcgt aaagtccat ttttgggcg 180
gaggatgcat cacacttgcc catgtctgcc aggcctggcc tgtttacgga cttcatttaa 240
ccgatttatt tgtttagccc aaaagtaatc gctctggagt agaaaccaa tgtaatagc 300
cacatcttac ctgtaaagtc ttacttgiga ttgtgcaaaa caaaaaatgt gccagaaag 359

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-R2 primer

<400> 10

tgtctcccag ttgcccata ggtgtgc 27

<210> 11

<211> 184

<212> DNA

<213> Human

<400> 11

cccgaggcg ccatgaggag cctgtgtgc gcccactcc tgctcctctt gctgtgccg 60
ccgctgtgc tcacgccccg cgctggggac gccgccgtga tcaccggggc ttgtgacaag 120
gactcccaat gtggtggagg catgtgtgt gctgtcagta tctgggtcaa gagcataagg 180
attt 184

<210> 12

<211> 23

9/44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-WF primer

<400> 12

ccatgaggag cctgtgctgc gcc 23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-WR primer

<400> 13

ctattcacat ttggtttcta ctc 23

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-CF primer

<400> 14

gtcgaccacc atgaggagcc tgtgctgcg 29

10/44

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, hBv8-SR primer

<400> 15

actagtcgat tacttttggg ctaaac 26

<210> 16

<211> 346

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

```
gtcgaccacc atgaggagcc tgtgctgcgc cccactcctg ctctctttgc tgctgccgcc 60
gctgctgctc acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgac accggggctt gtgacaagga 120
ctcccaatgt ggtggaggca tgtgctgtgc tgcagtatc tgggtcaaga gcataaggat 180
ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aagtccatt 240
ttttgggcgg aggatgcac acattgccc atgtctgcc ggcttggcct gtttacggac 300
ttcatttaac cgatttattt gtttagccca aaagtaatcg actagt 346
```

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> Human

11/44

<400> 17

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
 5 10 15
 Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
 20 25 30
 Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
 35 40 45
 Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu
 50 55 60
 Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg
 65 70 75 80
 Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg
 85 90 95
 Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys
 100 105

<210> 18

<211> 324

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

atgaggagcc tgtgctgcgc cccactcctg ctctctttgc tgcctccgcc gctgctgctc 60
 acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgac accggggctt gtgacaagga ctcccaatgt 120
 ggtggaggca tgtgctgtgc tgcagtatc tgggtcaaga gcataaggat ttgcacacct 180
 atgggcaaac tgggagacag ctgcatcca ctgactcgta aagtccatt ttttggcgcg 240
 aggatgcatc acacttgccc atgtctgcca ggcttggcct gtttacggac ttcatttaac 300
 cgatttattt gtttagccca aaag 324

12/44

<210> 19

<211> 81

<212> PRT

<213> Human

<400> 19

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly
 5 10 15
 Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr
 20 25 30
 Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val
 35 40 45
 Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly
 50 55 60
 Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Lys

<210> 20

<211> 243

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac tccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct 60
 gtcagtatct gggtaagag cataaggatt tgcacaccta tgggcaaact gggagacagc 120
 tgccatccac tgactcgtaa agttccattt ttggggcgga ggaigcatca cacttgccca 180
 tgtctgccag gcttggcctg tttacggact tcatttaacc gatttatitg tttagcccaa 240
 aag 243

13/44

<210> 21

<211> 80

<212> PRT

<213> Dendroaspis polylepis

<400> 21

Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Cys	Glu	Arg	Asp	Leu	Gln	Cys	Gly	Lys	Gly
				5					10					15	
Thr	Cys	Cys	Ala	Val	Ser	Leu	Trp	Ile	Lys	Ser	Val	Arg	Val	Cys	Thr
			20					25						30	
Pro	Val	Gly	Thr	Ser	Gly	Glu	Asp	Cys	His	Pro	Ala	Ser	His	Lys	Ile
			35					40						45	
Pro	Phe	Ser	Gly	Gln	Arg	Met	His	His	Thr	Cys	Pro	Cys	Ala	Pro	Asn
			50					55						60	
Leu	Ala	Cys	Val	Gln	Thr	Ser	Pro	Lys	Lys	Phe	Lys	Cys	Leu	Ser	Lys
			65					70						75	
															80

<210> 22

<211> 80

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Cys	Asp	Lys	Asp	Ser	Gln	Cys	Gly	Gly	Gly
				5					10					15	
Met	Cys	Cys	Ala	Val	Ser	Ile	Trp	Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ile	Cys	Thr
			20					25						30	
Pro	Met	Gly	Lys	Leu	Gly	Asp	Ser	Cys	His	Pro	Leu	Thr	Arg	Lys	Val

14/44

35	40	45
Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly		
50	55	60
Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln		
65	70	75
		80

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, BF2 primer

<400> 23

gcttgygaca aggactcyca 20

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, BR1 primer

<400> 24

gittyctacty cagagygat 19

<210> 25

15/44

<211> 210

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

```
gtgtggagga ggaatgtgct gcgctgtcag tatctgggtt aagagcataa ggatctgcac 60
acctatgggc caagtgggag acagctgccca ccccttgact cggaaagttc cattttgggg 120
gcggaggatg caccacactt gtccctgcct gccaggtttg gcatgtttaa ggacttcctt 180
caaccgtttt atttgtttgg cccggaagtg                                     210
```

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RB5-1 primer

<400> 26

```
gtgcatcctc cgcccccaaa atggaa                                     26
```

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RB5-3 primer

16/44

<400> 27

gacagcgag cacattcctc ctccacac 28

<210> 28

<211> 148

<212> DNA

<213> Human

<400> 28

cgcgctcccta accgccaccg cctcctcggg acgccatgga ggaccgcgc tggccccgc 60
tactgtact tttgctgcta ccgctgctgc tcacaccgcc cgccggggat gccgcggtca 120
tcaccggggc ttgcgacaag gactctca 148

<210> 29

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RB3-1 primer

<400> 29

gagacagctg ccaccccctg actcgga 28

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

17/44

<220>

<223> DNA primer, RB3-2 primer

<400> 30

ggcggaggat gcaccacact tgtccctg 28

<210> 31

<211> 150

<212> DNA

<213> Rat

<400> 31

cctgcctgcc aggtttggca tgtttaagga cttctttcaa ccgttttatt tgtttggccc 60
ggaagtgatc actctgaagc aggagctgga aatgtgaacc tctactcact gaacaatgtc 120
tgtcaagtct cgcttgtaat tgtgtcaaag 150

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RBv8-WF1 primer

<400> 32

taaccgccac cgcctcct 18

<210> 33

<211> 17

18/44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RBv8-WF2 primer

<400> 33

gggacgccat ggaggac

17

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RBv8-WR1 primer

<400> 34

cgagacttga cagacattgt tcagtg

26

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, RBv8-WR2 primer

<400> 35

tttccagctc ctgcttcaga

20

19/44

<210> 36

<211> 356

<212> DNA

<213> Rat

<400> 36

```

gggacgcat ggaggacccg cgctgtgcc cgctactgct acttttgctg ctaccgctgc 60
tgctcacacc gcccgccggg gatgccgagg tcatcaccgg ggcttgcgac aaggactctc 120
agtgtggagg aggaatgtgc tgcgctgtca gtatctgggt taagagcata aggatctgca 180
cacctatggg ccaagtggga gacagctgcc accccctgac tcggaaagtt ccattttggg 240
ggcggaggat gcaccacact tgtccctgcc tgccaggttt ggcatgttta aggacttctt 300
tcaaccgttt tatttgtttg gcccggaagt gatcactctg aagcaggagc tggaaa 356

```

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Rat

<400> 37

```

Met Glu Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
      5              10              15
Leu Leu Leu Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala
      20              25              30
Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser
      35              40              45
Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly
      50              55              60
Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg

```


20/44

65	70	75	80
Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr			
	85	90	95
Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys			
100	105		

<210> 38

<211> 321

<212> DNA

<213> Rat

<400> 38

```

atggaggacc cgcgctgtgc cccgctactg ctacttttgc tgctaccgct gctgctcaca 60
ccgccccgcc gggatgccgc ggtcatcacc ggggcttgcg acaaggactc tcagtgtgga 120
ggaggaatgt gctgcgctgt cagtatctgg gttaagagca taaggatctg cacacctaig 180
ggccaagtgg gagacagctg ccacccccig actcggaaag ttccattttg ggggcggagg 240
atgcaccaca ctgtccctg cctgccaggt ttggcatgtt taaggacttc tttcaaccgt 300
tttatttggt tggcccgga g 321

```

<210> 39

<211> 81

<212> PRT

<213> Rat or Mouse

<400> 39

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly		
	5	10
Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr		15
20	25	30

21/44

Pro Met Gly Gln Val Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val

35

40

45

Pro Phe Trp Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly

50

55

60

Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg

65

70

75

80

Lys

<210> 40

<211> 243

<212> DNA

<213> Rat

<400> 40

gcgggtcatca ccggggccttg cgacaaggac tctcagtggtg gaggaggaaat gtgctgcgct 60
 gtcagtatct ggggtaagag cataaggatc tgcacaccta tgggccaagt gggagacagc 120
 tgccaccccc tgactcggaa agttccattt tgggggcgga ggaatgcacca cacttgtccc 180
 tgcctgccag gtttggcatg ttttaaggact tctttcaacc gttttatttg tttggcccgg 240
 aag 243

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 1

<400> 41

22/44

gtcgacatgg agaccactgt ggggaccctg 30

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 2

<400> 42

actagtttat ttcagtcgga tgcagtcac 30

<210> 43

<211> 1179

<212> DNA

<213> Rat

<400> 43

atggagacca ctgtggggac cctgggagag aataccacaa acactttcac cgacttcttt 60
tctgcacgtg atggcagtgg agccgaaacc tcccccttgc cattcacttt cagctatggt 120
gactatgaca tgccttcgga tgaagaggag gatgtgacca actctcggac tttctttgct 180
gccaaagattg tcattggcat ggctttgggtg ggcatcatgc tgggtgtgtg catcggcaac 240
ttcatcttca tcactgcgct ggcccgtac aaaaagcttc gcaacctcac caacctgctt 300
atcgccaacc tggccatttc ggacttcctg gtagecatcg tgtgtgtccc ctttgagatg 360
gactactatg tggtaagcca gctctcctgg gagcacggcc atgtcctgtg cgctccgctc 420
aactacttgc gcaccgtctc cctctacgtg tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
gacaggtatc tggccattgt gcacccgctg agaccgagga tgaagtgtca aacggctgca 540
ggcctgatct tcttgggtgtg gtctgtgtcc atcctcatcg ccatcccagc cgcctacttc 600

23/44

accactgaga cgggtgttgg catcgtggaa agccaggaga agatcttctg cggccagatc 660
 tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggctct cggcctcgag 720
 ttctgtgggtc ctgtaatcgc catgaccctg tgctatgcca ggggtgtccc agagctctgg 780
 ttcaaggcgg tgcccggctt ccagacagag cagatccgcc ggaggctgcg ctgtcgccga 840
 cggacgggtac tggggctcgt gtgcgtcctt tccgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
 tatggcttca ccatcgtgcg tgacttcttc ccctccgtgt ttgtgaaaga gaagcactac 960
 ctcaccgcct tttatgtggt ggagtgcac gccatgagca acagtatgat caatacgctg 1020
 tgcttttga ctgtcaggaa taacaccagt aagttacctca agaggatcct gcggctccag 1080
 tggagggcct ctctagcgg gagcaaggcc agcgtgacc tcgacctcag gaccacgggg 1140
 attcctgcca cggaggaggt ggactgcac cgactgaaa 1179

<210> 44

<211> 393

<212> PRT

<213> Rat

<400> 44

Met	Glu	Thr	Thr	Val	Gly	Thr	Leu	Gly	Glu	Asn	Thr	Thr	Asn	Thr	Phe
				5				10					15		
Thr	Asp	Phe	Phe	Ser	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Gly	Ala	Glu	Thr	Ser	Pro
				20				25					30		
Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Asp	Met	Pro	Ser	Asp	Glu
				35				40					45		
Glu	Glu	Asp	Val	Thr	Asn	Ser	Arg	Thr	Phe	Phe	Ala	Ala	Lys	Ile	Val
				50				55					60		
Ile	Gly	Met	Ala	Leu	Val	Gly	Ile	Met	Leu	Val	Cys	Gly	Ile	Gly	Asn
				65				70					75		80
Phe	Ile	Phe	Ile	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Tyr	Lys	Lys	Leu	Arg	Asn	Leu
				85				90					95		

24/44

Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
 100 105 110
 Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
 115 120 125
 Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg
 130 135 140
 Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
 165 170 175
 Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
 195 200 205
 Val Glu Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
 210 215 220
 Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu
 225 230 235 240
 Phe Val Gly Pro Val Ile Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser
 245 250 255
 Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile
 260 265 270
 Arg Arg Arg Leu Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys
 275 280 285
 Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr
 290 295 300
 Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr
 305 310 315 320
 Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met

25/44

	325	330	335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr			
340	345	350	
Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser			
355	360	365	
Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr			
370	375	380	
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys			
385	390		

<210> 45

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, probe 1

<400> 45

cctcaccaay ctgctyatyg ccaacctggc c 31

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, probe 2

26/44

<400> 46

gtggtrcgsc agctctccig ggagca 26

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 1

<400> 47

tcccgggagc tctggttcaa ggc 23

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 2

<400> 48

gagtgcatcg ccatgagcaa cagcatg 27

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

27/44

<220>

<223> DNA primer, primer 3

<400> 49

ggcttgaacc agagctcccg gga 23

<210> 50

<211> 1263

<212> DNA

<213> Rat

<400> 50

atggtatcag ttctgtccaa caggacctc cacacactgg cccagctga agtgctgaac 60
tccacgtggg cctatctccc tgacacatac cagcctacct gccacatcat caacatggga 120
gaccagaacg gaaacacaag ctttgcacca gacttgaacc caccccaaga ccacgtctcc 180
ttgctccctt taaactacag ttaaggagat tatgacatcc ccctggatga cgatgaggat 240
gtgaccaaga cacagacctt ctttgcagcc aaaatcgta ttggcgtagc cctggcaggc 300
atcatgctag tctgcggcgt tggcaacttt gtcttcattg ctgccctcgc ccgctacaag 360
aagctgcga accttacc aa cctcctcctc gtaacctgg ccctctctga cttcctgggtg 420
gcgatcgtct gctgccccct tgagatggac tactacgtag tacgtcagct ttcttgggag 480
catggtcacg tgctttgtgc ctccgtcaac taccttcgta cagctcctct gtacgtctcc 540
accaatgctc tgctggccat cgctattgac agatatctcg ctattgtcca ccccttaaaa 600
cggatgaatt accagaccgc ctccctcctg atcgctttgg tctggatggc ctccatcctc 660
atcgccatcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc ttgttatcgt caagaatcag 720
gaaaagctct tctgtggta gatctggccc gtggaccagc agctctacta caaatcctac 780
ttcctcttcg tcttcgggct tgagtctgtg ggtcccgtag tcaactatgac cctgtgctat 840
gccaggatct cccaggagct ctggttcaag gctgtacctg gtttccagac ggagcagatc 900

28/44

cgcaagcgac tgcgctgccg ccgaaagaca gtcctattgc tcatgggtat cctcacagcc 960
 tacgtgctgt gctgggcgcc ttctatggc ttaccatag tgcgagactt cttccccacg 1020
 ctggttgtga aggagaagca ctacctcacc gccttctatg tcgtcgagtg catcgccatg 1080
 agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacgggtca agaacaacac catgaaatac 1140
 ttcaagaaga tgcgtgctgt gcactggcgg cctctcact acgggagtaa gtccagcgcg 1200
 gacctcgacc tcaaaaccag tggggttcct gccaccgaag aggtggactg tatcaggcta 1260
 aag 1263

<210> 51

<211> 421

<212> PRT

<213> Rat

<400> 51

Met	Val	Ser	Val	Leu	Ser	Asn	Arg	Asp	Leu	His	Thr	Leu	Ala	Pro	Ala
				5					10					15	
Glu	Val	Leu	Asn	Ser	Thr	Trp	Ala	Tyr	Leu	Pro	Asp	Thr	Tyr	Gln	Pro
			20					25					30		
Thr	Cys	His	Ile	Ile	Asn	Met	Gly	Asp	Gln	Asn	Gly	Asn	Thr	Ser	Phe
		35					40					45			
Ala	Pro	Asp	Leu	Asn	Pro	Pro	Gln	Asp	His	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu
		50				55					60				
Asn	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Asp	Ile	Pro	Leu	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp
	65				70				75					80	
Val	Thr	Lys	Thr	Gln	Thr	Phe	Phe	Ala	Ala	Lys	Ile	Val	Ile	Gly	Val
				85					90					95	
Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Met	Leu	Val	Cys	Gly	Val	Gly	Asn	Phe	Val	Phe
			100						105					110	
Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Tyr	Lys	Lys	Leu	Arg	Asn	Leu	Thr	Asn	Leu

29/44

115	120	125	
Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Val Cys			
130	135	140	
Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu			
145	150	155	160
His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser			
165	170	175	
Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr			
180	185	190	
Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser			
195	200	205	
Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro			
210	215	220	
Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln			
225	230	235	240
Glu Lys Leu Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr			
245	250	255	
Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro			
260	265	270	
Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp			
275	280	285	
Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu			
290	295	300	
Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala			
305	310	315	320
Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp			
325	330	335	
Phe Phe Pro Thr Leu Val Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe			
340	345	350	

30/44

Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile
 355 360 365
 Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met
 370 375 380
 Leu Leu Leu His Trp Arg Pro Ser His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala
 385 390 395 400
 Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp
 405 410 415
 Cys Ile Arg Leu Lys
 420

<210> 52

<211> 384

<212> PRT

<213> Human

<400> 52

Met Ala Ala Gln Asn Gly Asn Thr Ser Phe Thr Pro Asn Phe Asn Pro
 5 10 15
 Pro Gln Asp His Ala Ser Ser Leu Ser Phe Asn Phe Ser Tyr Gly Asp
 20 25 30
 Tyr Asp Leu Pro Met Asp Glu Asp Glu Asp Met Thr Lys Thr Arg Thr
 35 40 45
 Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val Ile Gly Ile Ala Leu Ala Gly Ile Met
 50 55 60
 Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Thr Arg
 65 70 75 80
 Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala
 85 90 95

31/44

Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala Ile Ile Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp			
100	105	110	
Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys			
115	120	125	
Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn			
130	135	140	
Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro			
145	150	155	160
Leu Lys Pro Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu			
165	170	175	
Val Trp Met Val Ser Ile Leu Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Ala			
180	185	190	
Thr Glu Thr Val Leu Phe Ile Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys			
195	200	205	
Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe			
210	215	220	
Leu Phe Ile Phe Gly Val Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr			
225	230	235	240
Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro			
245	250	255	
Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys			
260	265	270	
Thr Val Leu Val Leu Met Cys Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp			
275	280	285	
Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val			
290	295	300	
Phe Val Lys Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys			
305	310	315	320
Ile Ala Met Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Val Cys Phe Val Thr Val			

32/44

	325		330		335
Lys Asn Asn Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Met Leu Leu His Trp					
	340		345		350
Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg					
	355		360		365
Thr Asn Gly Val Pro Thr Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys					
	370		375		380

<210> 53

<211> 393

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 53

Met Glu Thr Thr Val Gly Ala Leu Gly Glu Asn Thr Thr Asp Thr Phe			
	5	10	15
Thr Asp Phe Phe Ser Ala Leu Asp Gly His Glu Ala Gln Thr Gly Ser			
	20	25	30
Leu Pro Phe Thr Phe Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu			
	35	40	45
Glu Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val			
	50	55	60
Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn			
	65	70	75
Phe Ile Phe Ile Thr Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu			
	85	90	95
Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala			
	100	105	110
Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu			

33/44

115	120	125
Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val Asn Tyr Leu Arg		
130	135	140
Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile		
145	150	155
Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys		
165	170	175
Gln Thr Ala Ala Gly Leu Ile Phe Leu Val Trp Ser Val Ser Ile Leu		
180	185	190
Ile Ala Ile Pro Ala Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile		
195	200	205
Val Glu Arg Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp		
210	215	220
Gln Gln Phe Tyr Tyr Arg Ser Tyr Phe Leu Leu Val Phe Gly Leu Glu		
225	230	235
Phe Val Gly Pro Val Val Ala Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Val Ser		
245	250	255
Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile		
260	265	270
Arg Arg Thr Val Arg Cys Arg Arg Arg Thr Val Leu Gly Leu Val Cys		
275	280	285
Val Leu Ser Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Ser Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr		
305	310	315
Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met		
325	330	335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Arg Asn Asn Thr Ser Lys Tyr		
340	345	350

34/44

Leu Lys Arg Ile Leu Arg Leu Gln Trp Arg Ala Ser Pro Ser Gly Ser

355

360

365

Lys Ala Ser Ala Asp Leu Asp Leu Arg Thr Thr Gly Ile Pro Ala Thr

370

375

380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys

385

390

<210> 54

<211> 381

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 54

Met Gly Pro Gln Asn Arg Asn Thr Ser Phe Ala Pro Asp Leu Asn Pro

5

10

15

Pro Gln Asp His Val Ser Leu Asn Tyr Ser Tyr Gly Asp Tyr Asp Leu

20

25

30

Pro Leu Gly Glu Asp Glu Asp Val Thr Lys Thr Gln Thr Phe Phe Ala

35

40

45

Ala Lys Ile Val Ile Gly Val Ala Leu Ala Gly Ile Met Leu Val Cys

50

55

60

Gly Ile Gly Asn Phe Val Phe Ile Ala Ala Leu Ala Arg Tyr Lys Lys

65

70

75

80

Leu Arg Asn Leu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp

85

90

95

Phe Leu Val Ala Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val

100

105

110

Val Arg Gln Leu Ser Trp Ala His Gly His Val Leu Cys Ala Ser Val

115

120

125

35/44

Asn Tyr Leu Arg Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu
 130 135 140
 Ala Ile Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Lys Pro
 145 150 155 160
 Arg Met Asn Tyr Gln Thr Ala Ser Phe Leu Ile Ala Leu Val Trp Met
 165 170 175
 Val Ser Ile Leu Ile Ala Val Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr
 180 185 190
 Ile Leu Val Ile Val Lys Asn Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile
 195 200 205
 Trp Ser Val Asp Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Val
 210 215 220
 Phe Gly Leu Glu Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr
 225 230 235 240
 Ala Arg Ile Ser Gln Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln
 245 250 255
 Thr Glu Gln Ile Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu
 260 265 270
 Leu Leu Met Gly Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe
 275 280 285
 Tyr Gly Phe Thr Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Val Val Lys
 290 295 300
 Glu Lys His Tyr Leu Thr Ala Phe Tyr Val Val Glu Cys Ile Ala Met
 305 310 315 320
 Ser Asn Ser Met Ile Asn Thr Ile Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asn
 325 330 335
 Thr Met Lys Tyr Phe Lys Lys Met Leu Arg Leu His Trp Arg Pro Ser
 340 345 350
 His Tyr Gly Ser Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ser Gly

36/44

355	360	365
Val Pro Ala Thr Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys		
370	375	380

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 55

Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro		
5	10	15
Leu Leu Phe Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala		
20	25	30
Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser		
35	40	45
Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly		
50	55	60
Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg		
65	70	75
Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr		
85	90	95
Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys		
100	105	

<210> 56

<211> 321

<212> DNA

<213> Mouse

37/44

<400> 56

atgggggacc cgcgctgtgc cccgctactg ctacttctgc tgctaccgct gctgttcaca 60
ccgccccgcc gggatgccgc ggtcatcacc ggggcttgcg acaaggactc tcagtgcgga 120
ggaggcatgt gctgtgctgt cagtatctgg gtttaagagca taaggatctg cacacctatg 180
ggccaagtgg gcgacagctg ccaccccctg actcggaag ttccattttg ggggcggagg 240
atgcaccaca cctgccccctg cctgccaggc ttggcgtgtt taaggacttc tttcaaccgg 300
tttatittgt tggcccgga a 321

<210> 57

<211> 243

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 57

gcggtcatca ccggggcttg cgacaaggac tctcagtgcg gaggaggcat gtgctgtgct 60
gtcagtatct gggttaagag cataaggatc tgcacaccta tggccaagt gggcgacagc 120
tgccaccccc tgactcgga agttccattt tggggcgga ggatgcacca cacctgcccc 180
tgccctgccag gcttggcgtg ttttaaggact tctttcaacc ggtttatttg cttggccgg 240
aaa 243

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 3

38/44

<400> 58

tcatgttgct ccactggaag g

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, primer 4

<400> 59

ccaattgtct tgaggtccag g

21

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA probe, ZAQc probe

<400> 60

ttcttacaat ggcggttaagt ccagtcag

29

<210> 61

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

39/44

<220>

<223> DNA primer, ZAQC Sal primer

<400> 61

gtcgacatgg agaccacat ggggttcatg g 31

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA primer, ZAQC Spe primer

<400> 62

actagtttat tttagtctga tgcagtcac ctcttc 36

<210> 63

<211> 1179

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 63

atggagacca ctgtcggggc tctgggtgag aataccacag acaccttcac cgacttcttt 60
tctgcactcg atggccatga agcccaaacc ggctcggttac cattcacttt cagctacgggt 120
gactatgaca tgcccctgga tgaagaggaa gatgtgacca attctcggac tttctttgct 180
gccaaagattg tcattggcat ggctttgggtg ggtatcatgc tagtgtgtgg catcggcaac 240
ttcatcttta tcactgccct ggcccgttac aaaaagctcc gcaacctcac caacctgctt 300

40/44

```

atcgccaacc tggccatttc agacttcctc gtggccatcg tgtgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggigcgcca gctctcctgg gagcatggtc atgtcctgtg cgcctctgtc 420
aactacttgc gtaccgtctc cctctacgtc tccactaacg ccctactggc cattgccatt 480
gacaggtatc tggccattgt gcacccgctg agaccgcgga tgaagtgtca aacagccgcc 540
ggcctgatct tcctgggtgtg gtcagtatcc atcctcatcg ccattccagc tgcctacttc 600
accactgaga ccgtgctggg catcgtggag agacaggaga agatcttctg tggtcagatc 660
tggccggtgg atcagcagtt ctactacagg tcctatttcc ttttggtttt cggcctcgag 720
ttcgtggggc ccgtagtcgc catgaccttg tgctatgccg ggggtgcccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tgccaggctt ccagacagag cagatccgcc ggacgggtgcg ctgccgccgc 840
aggacgggtc tggggctcgt gtgcgtcctc tctgcctatg tgctgtgctg ggctcccttc 900
tatggcttca ctatcgtgcg tgacttcttc cctccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcaccgcct tctatgttgt ggagtgcac gccatgagca acagcatgat caatacgtc 1020
tgctttgtga ctgtcaggaa taacaccagt aagtacctca agaggatcct gcggcttcag 1080
tggagggcct ctcccagcgg gagcaaggcc agcgtgacc tcgacctcag gaccacggga 1140
atacctgccg ccgaggaggt ggactgcac cgactgaaa 1179

```

<210> 64

<211> 1143

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 64

```

atgggacccc agaacagaaa cactagcttt gcaccagact tgaatccacc ccaagaccat 60
gtctccttaa actacagtta tggtgattat gacctcccc tgggtgagga tgaggatgtg 120
accaagacac agaccttctt tgcagccaaa attgtcattg gcgtggcact ggcaggcatc 180
atgctggtct gcggcattgg caactttgtc ttcatgtctg ccctcgcccc ctacaagaag 240
ctgcgcaacc tiaccaacct cctcattgct aacctggcca tctctgactt cctgggtggc 300
atcgtctgct gccccittga gatggactat tatgtagtac ggcagcttct ctgggcgcac 360
ggtcacgtgc ttgttgctc cgtcaactac cttcgtacgg tctccctgta cgtctccacc 420

```

41/44

```

aacgctctgc tggccatcgc tattgacaga tacctcgcta ttgtccaccc ttigaaacca 480
cggatgaatt atcagaccgc ttccttcctg atcgctttgg tctggaiggt ctccatcctc 540
atcgctgtcc catctgccta cttcaccaca gaaaccatcc tcgttatcgt caagaatcaa 600
gaaaaaatct tctgtggta gatctggtcg gtggaccagc agctctacta caaatcctac 660
ttcctcttcg tcttcgggct tgagttcgtg ggtcccgtag tcactatgac cctgtgctat 720
gccaggatct cccaagagct ctggttcaag gctgtacctg gcttccagac ggagcaaadc 780
cgcaagcggc tgcgttgccg ccgcaagaca gtgctactgc tcatgggcat cctcacagcc 840
tacgtgtgtg gctgggcgcc gtctatggc ttaccatag tgcgagactt cttccccacg 900
gtagtgtga aggagaagca ctacctacc gccttctacg tcgtggagtg cattgccatg 960
agcaacagca tgatcaatac tatatgcttc gtgacggta agaacaacac catgaaatac 1020
ttcaagaaga tgctgcggct ccaactggcg cctctcact acgggagtaa gtccagcgct 1080
gacctcgacc tcaaaaccag cggggtcct gccactgaag aggtggattg tatcagacta 1140
aag 1143

```

<210> 65

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 65

```

tatggcggtg attaccggcg cgtgcgataa agatagccag tgcggtagcg gtatgtgctg 60
tgcggtagcg atttgggtga aa 82

```

<210> 66

<211> 82

<212> DNA

42/44

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 66

agcattcgta ttgaccccc gatgggcaaa ctgggcgata gctgccatcc gctgaccgt 60
aaagtgccgt tttttggccg cc 82

<210> 67

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 67

gtagcatca tacctgcccg tgccctgccg gcctggcgtg cctgcgcacc agctttaacc 60
gctttatttg cctggcgcag aaatagg 87

<210> 68

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

43/44

<400> 68

cgaatgcttt tcacccaaat gtcaccgca cagcacatac cgccaccgca ctggctatct 60
ttatcgcacg caccggtaat caccgcca 88

<210> 69

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 69

atgatgcata cgcgccgcaa aaaacggcac ttacgggtc agcggtatggc agctatcgcc 60
cagtttgccc atcggggtgc aaata 85

<210> 70

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 70

gateccctatt tctgcgccag gcaaataaag cggttaaagc tggcgcgcag gcacgccagg 60
cccggcaggc acgggcaggt 80

<210> 71

<211> 243

<212> DNA

〈213〉 Artificial Sequence

<220>

〈223〉

<400> 71

```

gcggtgatta ccggtgctg cgataaagat agccagtgcg gtggcggat gtgctgtgcg 60
gtgagcattt gggtgaaaag cattcgtatt tgcaccccgga tgggcaaact gggcgatagc 120
tgccatccgc tgaccgctaa agtgccgttt ttiggccgcc giatgcatca tacctgcccg 180
tgccigccgg gccitggcgtg cctgcgcacc agctttaacc gcittatttg cctggcgcag 240
aaa . 243

```